

Ecotoxicité comparative de l'oxyde de graphène et d'autres nanoparticules de carbone chez des organismes aquatiques modèles : d'une évaluation en conditions monospécifiques vers l'étude d'une chaîne trophique expérimentale

Laura Lagier





En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Laura LAGIER

Le mercredi 8 novembre 2017

Titre :

Ecotoxicité comparative de l'oxyde de graphène et d'autres nanoparticules de carbone chez des organismes aquatiques modèles : d'une évaluation en conditions monospécifiques vers l'étude d'une chaîne trophique expérimentale

---

Ecole doctorale et discipline ou spécialité : ED SDU2E : Ecologie fonctionnelle

Unité de recherche : Ecolab, UMR 5245

Directeur/trice(s) de Thèse :
M. Laury GAUTHIER, MCF
Mme Florence Mouchet, IR

Jury :
Mme Laure GIAMBERINI, Pr CNRS - Rapporteur
Mme Catherine MOUNEYRAC, Pr UCO - Rapporteur
Mme Michelle GUE, Pr UPS - Examinatrice et Présidente du jury
M. Patrice GONZALEZ, CR CNRS - Examinateur
M. Eric PINELLI, Pr INPT – Invité
M. Emmanuel FLAHAUT, DR UPS – Invité
M. Laury GAUTHIER, MCF UPS - Directeur de thèse
Mme Florence MOUCHET, IR CNRS - Codirectrice de thèse

A mes parents,
mes meilleurs professeurs

A ma famille

REMERCIEMENTS



Je remercie tout d’abord l’UPS, l’école doctorale SDU2E et le Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche pour avoir contribué au financement et à la réalisation de cette thèse. Je remercie de même le Flagship Graphene, l’ANR DECANO et l’ANR MESONNET pour leur contribution financière aux travaux effectués.

Je souhaite également remercier Laure Giamberini, Catherine Mouneyrac, Michelle Gué, Patrice Gonzalez, Eric Pinelli et Emmanuel Flahaut, membres du jury de cette thèse, d’avoir accepté de lire et commenter ces travaux. Leurs remarques et suggestions judicieuses ont non seulement permis d’améliorer la qualité de cet ouvrage, mais ont aussi grandement contribué au bon déroulement de la soutenance.

J’adresse mes remerciements à Laury Gauthier, Florence Mouchet, Eric Pinelli, Patrice Gonzalez et Arnaud Elger, pour leur participation en tant que membres de mon comité de pilotage, et pour leurs conseils avisés.

Plus particulièrement, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Laury Gauthier et Florence Mouchet, pour m’avoir donné ma chance sur ce sujet de thèse, pour leur patience, et le temps qu’ils ont accordé à ma préparation aux communications orales pour les congrès. Nos réunions m’ont beaucoup apporté pour mener à bien ces travaux. Merci en particulier à Florence pour sa disponibilité et son aide à la paillasse à chaque fin de « manip xénope », et pour son investissement dans les corrections lors de la rédaction des publications et du manuscrit.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à Eric Pinelli pour l’intérêt qu’il a manifesté à l’égard de ces travaux, son investissement, sa confiance, ses encouragements, les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir, et son enthousiasme communicatif aussi bien lors de la thèse elle-même que pour la partie enseignements.

Un grand merci aussi à Patrice Gonzalez pour sa pédagogie, la pertinence de ses remarques, et son aide précieuse sur tout le volet biologie moléculaire. J’en profite pour adresser mes sincères remerciements à tous les membres du laboratoire EPOC d’Arcachon que j’ai pu côtoyer et qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ces travaux. Je pense en particulier à Cerise Daffe et à Alexia Legeay qui ont eu la gentillesse de m’accorder du temps et de me

former, et à Florence Daniel pour sa bienveillance. Je garderai de très bons souvenirs de mes séjours au sein de votre laboratoire, et je suis très heureuse d'avoir pu concrétiser à la paillasse des connaissances que je n'avais vues jusque-là qu'en théorie. Je trouve toujours aussi magique de voir fonctionner des gènes !

De plus, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est sans le CIRIMAT et son équipe NNC. Je remercie vivement Emmanuel Flahaut pour nos nombreux échanges, sa réactivité, la qualité de ses remarques, et l'intérêt constant qu'il a manifesté pour un domaine d'étude qui n'est à l'origine pas le sien. Merci aussi à Cyril Sarrieu et Pierre Lonchambon pour leur disponibilité et le travail de caractérisation et de préparation des nanoparticules qu'ils ont fourni, et à George Chimowa qui a pris la relève. Travailler avec nos collègues physico-chimistes a été très enrichissant et m'a convaincue de l'importance de la pluridisciplinarité pour mener à bien des études écotoxicologiques, en particulier en ce qui concerne les nanoparticules.

Je voudrais remercier chaleureusement Annick Corrège et Catherine Donati pour la gentillesse, la disponibilité et la patience dont elles ont fait preuve. Merci aussi à Franck Gilbert, Georges Merlina, Jérôme Sylvestre, Annie Perrault, Myriam Cousseau, Arnaud Elger, Maïalen Barret, Séverine Jean, Camille Larue et à tous les membres de l'équipe ECI du laboratoire Ecolab pour leur sympathie et leur aide. Certains d'entre vous m'ont permis de débloquer des situations difficiles et de mettre en place de nouveaux protocoles expérimentaux (j'ai maintenant la recette des petits fours à 750°C grâce à Jérôme ;-)). Un grand merci à Christophe Laplanche pour son aide précieuse lors du développement des modèles de croissance et la réflexion qu'il a permis d'apporter. Merci beaucoup aussi à David Baqué pour sa pédagogie et le temps qu'il a consacré à me former sur le traitement des résultats et le fonctionnement de l'ICP. Dommage de ne pas avoir eu le temps d'analyser d'autres échantillons, j'aurais été très curieuse de savoir si on pouvait utiliser les métaux comme traceurs des nanoparticules dans les organismes ! Merci à Stéphanie Cadarsi de m'avoir initiée aux manips monospécifiques et à Antoine Mottier pour avoir largement contribué à la réalisation du système de mésocosme. Merci à vous deux pour votre contribution aux manips, ainsi qu'à Lauris Evariste qui a pris la relève sur le projet Flagship (courage pour la suite !!!).

Je voudrais aussi adresser une pensée amicale à Antoine Minet et Eric Pignol, sans oublier mes collègues de bureau qui se sont succédés, Agathe Bour et Laurent Verneuil au tout début de ma thèse, et puis ceux que j'ai pu côtoyer plus longtemps : Stéphane Mombo, Marion Garacci, Eva Roubeau, et enfin Clarisse Liné. Merci pour votre soutien, pour votre complicité, et pour tous ces moments passés ensemble à se remonter le moral, mais aussi à rire, et à parler (et parler, et

parler … science bien-sûr ;-)) ! Je repenserai toujours avec plaisir à nos petites sorties (même si je n'étais pas très assidue…), à nos repas à la Cité Impériale de temps en temps, ou encore à la chasse aux araignées dans le bureau et à nos batailles de citrons ! Merci en particulier à Eva et Marion pour m'avoir supportée sur le long terme ;-)

Je tiens aussi à remercier tous les stagiaires de licence, BTS ou master et les DESU qui ont permis de faire avancer les travaux de « l'équipe xénope » : Luc Chevalier, Mathieu Alix, Angélique Cerisier, Fanny Pagès et Sandy Bétirac. En particulier, je voudrais exprimer toute ma gratitude et ma sympathie pour ceux qui ont directement contribué à mon travail de thèse : Alpha Diallo pour son implication et son sérieux lors des expositions en mésocosmes, et Chloé Chary pour son travail minutieux sur les chironomes (fironomes !). Merci à tous de vous être montrés volontaires, j'espère que votre passage à Ecolab vous aura permis de construire votre propre opinion de la recherche et de guider vos choix avenirs. Je n'oublie pas non plus Elise Ompraret pour son aide précieuse apportée côté CIRIMAT pour les mesures et l'interprétation des données du Turbiscan : merci de m'avoir donné de ton temps lorsque je n'en avais plus. Je te souhaite une excellente continuation !

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance à l'équipe BIZ (autrefois Biogéochim) avec laquelle j'ai démarré à Ecolab lors d'un stage de L2 puis de M2. Merci en particulier à Camille Dumat, Thibaut Lévêque, Marie-José Tavella et Samuel Tessier pour m'avoir apporté leur encadrement, leur soutien et leur sympathie pendant le stage de M2 et au-delà. Je remercie aussi mes professeurs de licence, en particulier Florence Geret, Eva Schreck, Pierre Marty et Wafa Bouzid, qui m'ont fait découvrir les premiers le domaine de l'écotoxicologie et m'ont donné envie de m'y lancer, ainsi que Hugues Chap qui, dès ma première année de médecine, m'avait déjà implicitement orientée vers le monde de la recherche.

Hors équipe, je tiens également à remercier tout le personnel de l'ENSAT ayant contribué au bon déroulement de ces travaux, notamment pour ce qui est de la logistique et de l'aide technique.

De plus, j'ai été très heureuse de pouvoir prendre part aux enseignements en parallèle de ces travaux de thèse. J'ai ainsi pu apporter ma modeste contribution à l'encadrement des TP de microbiologie aux côtés d'Eric Pinelli, Sandra Beaufort, Carol Verheecke, Elodie Choque (qui m'a également dispensé des cours particuliers de crochet ;-)) et Rhoda El Khoury, sans oublier l'aide de Catherine Giovannini. Merci à vous tous pour vos conseils et votre confiance ! Je

souhaite à quiconque voulant se lancer dans l'enseignement de pouvoir évoluer en présence de personnes telles que vous.

Je ne peux pas oublier de remercier mes amis, ceux de toujours comme ceux rencontrés ces dernières années, pour le réconfort qu'ils m'ont apporté, parfois malgré la distance, et qui m'a été plus qu'utile pour avancer.

Enfin, j'adresse une pensée pleine d'amour à ma famille. Je ne saurais trouver les mots pour dire à quel point vous m'avez portée. Mes efforts sont aussi les vôtres. Vous avez été ma force, mon moteur, mon refuge, tout au long de mon parcours et pas seulement ces trois dernières années. Merci pour votre confiance. Un merci tout particulier à mon Thomas pour m'avoir toujours soutenue (et supportée !) et encouragée dans mes choix. Tu as su me faire rire même dans les moments les plus difficiles :-)

Table des matières

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AIC : Akaike Information Criterion (critère d'information d'Akaike)

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide RiboNucléique

CB : Carbon Black (noir de carbone)

CEA : Laboratoire Capteurs Diamants du Comissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives

CIRIMAT : Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux

CNP / NPC : Carbon-based NanoParticle (NanoParticule de Carbone)

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CCVD : Catalyst Chemical Vapor Deposition (dépôt de vapeurs chimiques)

CLP : Classification, Labelling, Packaging (classification, étiquetage, emballage)

CMC : CarboxyMéthylCellulose

CNT : Carbon NanoTubes (nanotubes de carbone)

CP : CycloPhosphamide

DWCNT : Double-Walled Carbon NanoTubes (nanotubes de carbone double paroi)

ECHA : European CHemicals Agency (agence européenne des produits chimiques)

EDR : Eau Déionisée Reconstituée

ENSAT : Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse

EPOC : Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux

FLG : Few Layer Graphene (graphène à petit nombre de feuillets)

FLG-ball : FLG synthétisé par « ball milling » (broyage à billes)

FLG-pencil : FLG synthétisé par « pencil lead » (ablation de mine de crayon)

GFM : Graphene Family Materials

G3N : Graphène, Nouveaux paradigmes, Nanomédecine, Nanométrologie

GO : Graphene Oxide (oxyde de graphène ; graphène oxydé)

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry

ICP-OES : Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

INPT : Institut National Polytechnique de Toulouse

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

IRSST : Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail

ISO : International Organization for Standardization (organisation internationale de normalisation)

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MNE : MicroNucleated Erythrocytes

MLG : Multi Layer Graphene (graphène multi feuillets)

MWCNT : Multi-Walled Carbon NanoTubes (nanotubes de carbone multi paroi)

NAUTILE : NAnotUbes et ecoToxIcoLogiE, laboratoire commun issu du partenariat entre le Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT), l'Université Paul Sabatier (UPS) et l'entreprise ARKEMA-France

ND : NanoDiamond (nanodiamant)

NNC : Nanocomposites et Nanotubes de Carbone (équipe du CIRIMAT)

NP : NanoParticle

NPC / CNP : NanoParticule de Carbone (Carbon-based NanoParticle)

OCDE / OECD : Organisation de Coopération et de Développement Economiques / Organisation for Economic Cooperation and Development

REACH : Registration Evaluation, Authorization of Chemicals (enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques)

rGO : reduced Graphene Oxide (oxide de graphène réduit)

rGO200 : rGO réduit thermiquement à 200°C

rGO1000 : rGO réduit thermiquement à 1000°C

ROS : Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)

SCENIHR : Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (comité scientifique des risques sanitaires émergents et nouveaux)

SRNOM : Suwannee River Natural Organic Matter

SWCNT : Single-Walled Carbon NanoTubes (nanotubes de carbone simple paroi)

UCLM : Universidad de Castilla~La Mancha

UPS : Université Paul Sabatier

US EPA : United States Environmental Protection Agency (agence américaine de protection de l'environnement)

WPMN : Working Party on Manufactured NanoMaterials

XPS : X-ray Photoelectron Spectrometry (spectrométrie photoélectronique X)

La compréhension des effets biologiques potentiels dus aux nanoparticules est inhérente à la connaissance de leurs caractéristiques physico-chimiques. Multidisciplinaire par définition, l'étude écotoxicologique présentée dans ce manuscrit a été réalisée dans le cadre de la collaboration (depuis 2005) de deux laboratoires aux compétences complémentaires. L'équipe d'ECotoxicologie Intégrative (ECI) du laboratoire Ecolab (UMR 5245) apporte son expérience concernant l'évaluation de la toxicité des nanoparticules sur le vivant. L'équipe Nanocomposites et Nanotubes de Carbone (NNC) du Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux (CIRIMAT, UMR 5085, Institut Carnot) apporte, quant à elle, son expertise dans la caractérisation physico-chimique des nanoparticules de carbone (NPC). Une partie de ces travaux de thèse a également été réalisée au sein de la plateforme de Biologie Moléculaire de l'UMR 5805 Environnement et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), qui bénéficie d'une expertise en transcriptomique, génotypage et protéomique.

Les NPC utilisées dans cette thèse ont des provenances diverses. L'oxyde de graphène (GO, en anglais « graphene oxide ») et le graphène multi-feuillets « ball » (FLG-ball, en anglais « few layer graphene synthetized by ball-milling ») ont été fournis par l'UCLM (Universidad de Castilla~La Mancha) dans le cadre du projet européen Graphene Flagship. Ce projet, fondé en 2013, représente une forme sans précédent de coordination à l'échelle internationale entre divers acteurs universitaires et industriels. Il couvre l'ensemble des aspects ayant trait au graphène depuis sa production et son intégration dans des composants jusqu'à ses retombées sur la santé et l'environnement. Un autre graphène multi-feuillets (FLG-pencil, en anglais « few layer graphene synthetized by pencil lead ») a quant à lui été fourni par l'Institut de Physique et de Chimie des matériaux de Strasbourg (IPCMS) dans le cadre du projet Défi NANOS démarré en 2012 : Graphène, Nouveaux paradigmes, Nanomédecine, Nanométrologie (G3N). De plus, les nanotubes de carbone double paroi utilisés dans cette thèse (DWCNT, en anglais « double-walled carbon nanotubes ») ont été produits par l'équipe NNC du CIRIMAT. Quant aux nanotubes de carbone multi-paroi (MWCNT, en anglais « Multi-walled carbon nanotubes »), ils ont été fournis par la société ARKEMA dans le cadre de la création d'un laboratoire commun en 2010 (NAUTILE : NAnotUbes et écoToxIcoLogiE) regroupant divers acteurs publics et privés (Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut

National Polytechnique de Toulouse (INPT), Université Paul Sabatier (UPS), Arkéma-France). Par ailleurs, les nanodiamants (ND) mentionnés dans ce mémoire proviennent du Laboratoire Capteurs Diamant du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA). Enfin, le noir de carbone (CB, en anglais « carbon black ») est issu du commerce (Evonik, lamp black 101).

Dans un contexte économique où l'utilisation des NPC va croissant, étudier le risque que pourraient représenter leurs retombées sur le vivant s'avère nécessaire. A l'interface entre la toxicologie environnementale et l'écotoxicologie, cette thèse se propose d'étudier les effets des NPC sur le milieu aquatique. Avec pour ultime perspective la compréhension des effets engendrés au sein d'un écosystème complexe, ces travaux constituent une première étape dans la démarche d'évaluation du risque environnemental. Dans l'intention d'étudier l'impact des NPC sur une chaine trophique carnivore, il convient de considérer avant tout les effets de ces dernières à des échelles d'organisation inférieures. Ainsi, cette thèse étudie la toxicité des NPC à l'échelle mono-spécifique (c'est-à-dire, espèce par espèce), avant de s'ouvrir sur les premiers effets observés chez des espèces en interaction au sein d'une chaine trophique expérimentale (mésocosme). Utilisés depuis de nombreuses années au laboratoire Ecolab, trois modèles biologiques se sont avérés pertinents pour l'évaluation des effets des NPC sur le milieu dulçaquicole : le xénope (*Xenopus laevis*, consommateur primaire), le chironome (*Chironomus riparius*, consommateur primaire) et le pleurodèle (*Pleurodeles waltl.*, prédateur).

Chaque organisme a été l'objet de différentes analyses de toxicité, en particulier le xénope qui occupe la plupart des pages de ce manuscrit. A travers les réponses biologiques mesurées (mortalité, croissance, retard de développement, tératogénicité, génotoxicité, expression des gènes), les mécanismes de toxicité impliqués ont fait l'objet de notre questionnement.

Ainsi, ces travaux se sont donné pour objectifs :

- D'évaluer les effets de différents allotropes de carbone sur la croissance du xénope, en vue de faire ressortir la principale caractéristique physico-chimique commune à toutes les NPC étant à l'origine de l'effet observé.
- De concentrer l'évaluation des effets génotoxiques sur une nanoparticule -l'oxyde de graphène- et d'en rechercher les mécanismes de toxicité associés au niveau de l'expression des gènes chez le xénope.

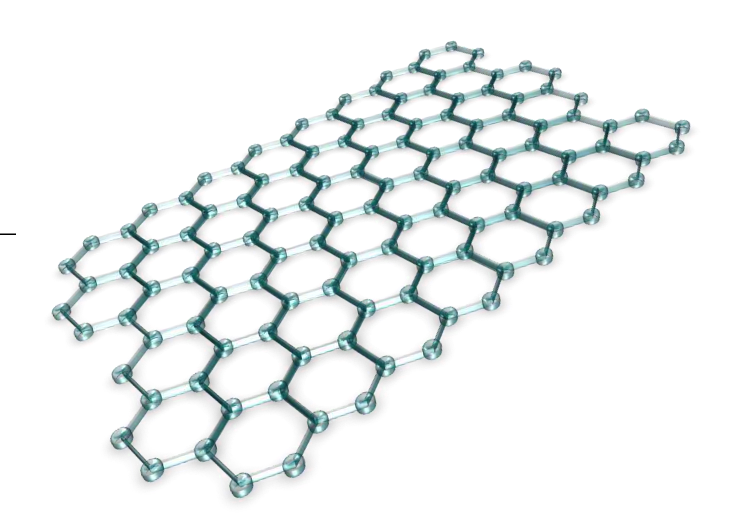
- De préparer l'évaluation des effets de l'oxyde de graphène au sein d'un écosystème complexe en analysant la toxicité induite chez les autres maillons de la chaine trophique expérimentale choisie : le pleurodèle et le chironome.

Dans ce cadre, le présent manuscrit s'articule selon les sept chapitres suivants :

- Le premier chapitre est une introduction bibliographique visant essentiellement à présenter les nanoparticules carbonées au sein des nanoparticules. L'accent est mis sur la description des propriétés ainsi que des effets du graphène et des nanotubes de carbone sur les milieux aquatiques et les organismes les constituant.
- Le deuxième chapitre présente les modèles biologiques et les nanoparticules de carbone utilisés dans cette thèse.
- Le troisième chapitre présente une vue assez large de la toxicité de 11 allotropes de nanocarbone sur la croissance de l'amphibien *Xenopus laevis* à l'état larvaire. La surface des particules est proposée plutôt que leur masse pour décrire la toxicité chronique observée.
- Le quatrième chapitre focalise sur l'oxyde de graphène et sur ces effets génotoxiques (formation de micronoyaux) à faible dose chez *Xenopus laevis*. Le cas de l'amphibien *Pleurodeles waltl*. est évoqué.
- Le cinquième chapitre vise à approfondir la compréhension des mécanismes de toxicité de l'oxyde de graphène à travers une analyse de l'expression des gènes chez *X. laevis*.
- Le sixième chapitre étudie les effets de l'oxyde de graphène chez un autre organisme : la larve du macroinvertébré benthique *Chironomus riparius*.
- Le septième chapitre présente les résultats préliminaires des effets de l'oxyde de graphène sur une chaine trophique reconstituée en mésocosme, impliquant les organismes précédemment étudiés dans cette thèse à l'échelle monospécifique.

Enfin, une discussion générale reprend l'ensemble des travaux réalisés et en donne quelques perspectives.

CHAPITRE 1



INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le « nanomonde »

1.1. Nanotechnologies : de l'apparition au développement

Manipuler la matière à l'échelle de l'atome et créer des machines à l'échelle nanométrique : c'est par cette vision que le célèbre physicien Richard Feynman ouvre la voie sur une nouvelle dimension lors de son discours à l'American Physical Society en 1959. L'intérêt porté très tôt à la miniaturisation ne représentait alors que perspectives, mais celles-ci devaient se concrétiser dans les années 1990 pour voir apparaitre les premières utilisations des nanomatériaux dans l'industrie. Il faudra cependant attendre le début des années 2010 pour assister à une véritable explosion du développement des technologies dites « nano », lesquelles pourraient représenter une nouvelle révolution industrielle selon les économistes.

Ce terme de « nano » (du grec *nanos* qui signifie nain) fait référence à une unité métrique (le nanomètre) égale à 10^{-9} mètre, soit approximativement 1/50000 de l'épaisseur d'un cheveu humain. Ainsi, selon la définition proposée par l'Institut national de Recherche et de Sécurité (INRS, 2016), « les nanotechnologies reposent sur la connaissance et la maîtrise de l'infiniment petit. Elles regroupent l'ensemble des techniques qui permettent de fabriquer, de manipuler et de caractériser la matière à l'échelle nanométrique ». Quant aux nanomatériaux, ils sont définis par la norme ISO TS 80004-1 (2010) comme « matériaux dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire comprise entre approximativement 1 et 100 nm ou qui possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique». Les nanomatériaux regroupent aussi bien des matériaux nanostructurés[1] (agrégats[2] et agglomérats[3] de nano-objets, nanocomposites[4] et matériaux nanoporeux[5]) que des nano-objets, c'est-à-dire des matériaux dont une (nano-feuillets ou nano-plaquettes), deux (nanofibres ou nanotubes) ou trois dimensions externes (nanoparticules[6]) est (sont) inférieure(s) à 100 nm. Au sens strict, une nanoparticule (NP) présente donc trois dimensions externes à l'échelle nanométrique. Néanmoins, cette définition est souvent passée outre dans la littérature où il est courant d'employer le terme de nanoparticule pour tout objet dont au moins une dimension est inférieure

---

[1] Matériaux nanostructurés : matériaux ayant leur structure interne ou leur surface interne à l'échelle nanométrique.
[2] Agrégat : particule elle-même constituée de particules fortement liées ou fusionnées.
[3] Agglomérat : amas de particules ou d'agrégats faiblement liés dont la surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels.
[4] Nanocomposites : matériaux composés tout ou partie de nano-objets qui, incorporés à une matrice ou à une surface, permettent d'apporter des propriétés améliorées ou spécifiques de la dimension nanométrique.
[5] Matériaux nanoporeux : matériaux possédant des pores de taille nanométrique (exemple : aérogels de silice).
[6] Particule (nano-) : fragment de matière possédant des contours physiques bien définis.

à 100 nm (Gaffet, 2011). Ainsi, tous les nano-objets étudiés dans ce manuscrit feront uniquement référence à ce terme.

1.2. Des propriétés uniques, une pléthore d'applications…

L'échelle même des NP est à l'origine de l'engouement qui gravite autour d'elles. Leur surface spécifique élevée ($m^2.kg^{-1}$) leur confère des propriétés intrinsèques différentes de leurs homologues non-nanométriques (matériaux de même composition mais de taille plus grande). Plus la taille d'une particule diminue, plus sa surface spécifique augmente (Figure 1). Par conséquent, ce rapport volume/surface ouvre la voie à de nombreuses applications dans des domaines extrêmement variés, mais peut en contrepartie grandement conditionner leur toxicité de même que leur devenir dans l'environnement (Nel et al., 2006).

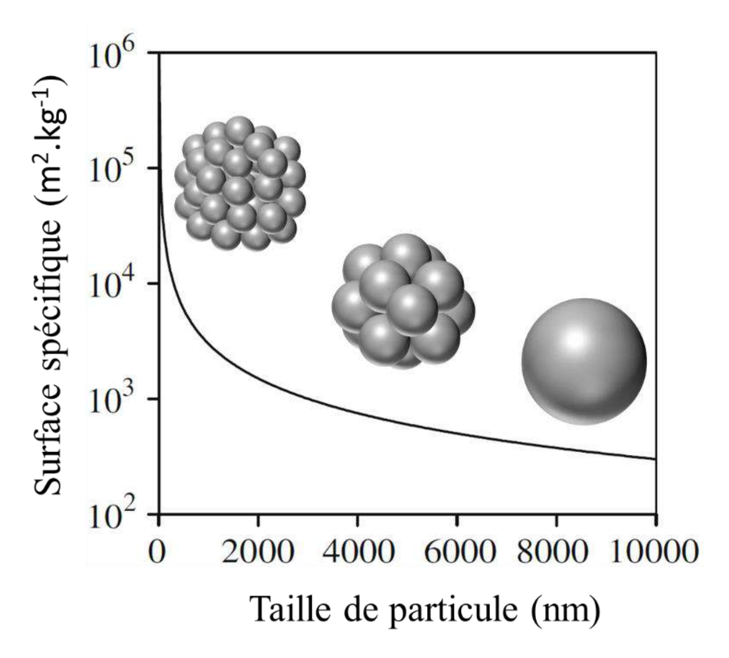


Figure 1. Relation entre surface spécifique ($m^2.kg^{-1}$) et taille (diamètre en nm) d'une particule sphérique de densité 1000 $kg.m^{-3}$ prise pour exemple (d'après Navarro *et al.* 2008). Plus la taille d'une particule diminue, plus sa surface spécifique augmente tandis que le volume est conservé (les sphères ont été ajoutées à la figure originale pour illustrer ce phénomène)

Les NP peuvent être d'origine anthropique, mais aussi naturelle, à l'instar des argiles (phyllo-silicates) qui sont très abondantes sur terre et peuvent atteindre des dimensions nanométriques. La combustion incomplète de combustibles carbonés ou d'énergie fossiles peut également donner naissance à des NP, notamment lors d'incendies ou d'éruptions volcaniques (Navarro *et al.*, 2008). De même, d'autres phénomènes tels que l'érosion des roches ou les réactions photochimiques peuvent produire des NP (Luther et Rickard, 2005). La vie a donc évolué en présence de NP naturelles. Néanmoins, l'exposition à de nouveaux types de NP ou à des concentrations plus importantes pourrait avoir des impacts sur le vivant (Gaffet, 2011; Wiesner

et al., 2009). Les NP d'origine anthropique peuvent être produites de manière intentionnelle ou non. Ce sont des NP dites manufacturées (produites intentionnellement et de façon spécifique) qui feront l'objet de ce manuscrit. Cette catégorie de NP se développe aujourd'hui dans une grande variété de secteurs d'activité et de nombreux produits du quotidien. Les secteurs utilisant des nanomatériaux manufacturés sont ainsi présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. applications des nanotechnologies et des nanomatériaux en fonction des secteurs d'activité (d'après l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS, 2016))

Secteurs d'activité	Exemples d'applications actuelles et potentielles
Automobile, aéronautique et aérospatial	Matériaux renforcés et plus légers ; peintures extérieures avec effets de couleur, plus brillantes, anti-rayures, anti-corrosion et anti-salissures ; capteurs optimisant les performances des moteurs ; détecteurs de glace sur les ailes d'avion ; additifs pour diesel permettant une meilleure combustion ; pneumatiques plus durables et recyclables, etc.
Electronique et communications	Mémoires à haute densité et processeurs miniaturisés ; cellules solaires ; bibliothèques électroniques de poche ; ordinateurs et jeux électroniques ultra-rapides ; technologies sans fil ; écrans plats, etc.
Agroalimentaire	Emballages actifs ; additifs : colorants, anti-agglomérants, émulsifiants, etc.
Chimie et matériaux	Pigments ; charges ; poudres céramiques ; inhibiteurs de corrosion ; catalyseurs multi-fonctionnels ; textiles et revêtements anti-bactériens et ultra-résistants, etc.
Construction	Ciments autonettoyants et anti-pollutions, vitrages autonettoyants et anti-salissures ; peintures ; vernis ; colles ; mastics, etc.
Pharmacie et santé	Médicaments et agents actifs ; surfaces adhésives médicales anti-allergènes ; médicaments sur mesure délivrés uniquement à des organes précis ; surfaces bio-compatibles pour implants ; vaccins oraux ; imagerie médicale, etc.
Cosmétique	Crèmes solaires transparentes ; pâtes à dentifrice abrasives ; maquillage avec une meilleure tenue, etc.
Energie	Cellules photovoltaïques nouvelle génération ; nouveaux types de batteries ; fenêtres intelligentes ; matériaux isolants plus efficaces ; entreposage d'hydrogène combustible, etc.
Environnement et écologie	Diminution des émissions de dioxyde de carbone ; production d'eau ultrapure à partir d'eau de mer ; pesticides et fertilisants plus efficaces et moins dommageables ; analyseurs chimiques spécifiques, etc.
Défense	Détecteurs d'agents chimiques et biologiques ; systèmes de surveillance miniaturisés ; systèmes de guidage plus précis ; textiles légers et qui se réparent d'eux-mêmes, etc.

Le marché des NP et de leurs produits dérivés connait un essor constant, même si la très grande variabilité des données chiffrées présentée par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES, 2014) illustre la difficulté à réaliser

une analyse précise et fiable de leurs production et utilisations. En particulier, les informations recueillies dépendent de la manière dont les enquêtes sont menées, du secteur d'activité des auteurs de l'enquête ainsi que du degré de coopération du secteur industriel. Néanmoins, le marché mondial des NP manufacturées était estimé à plusieurs billions de dollars par an en 2016, avec un taux de croissance annuel prévu à plus de 18 % jusqu'en 2021 (McWilliams, 2016). A l'échelle nationale, une étude de l'INRS estimait déjà à plusieurs centaines de milliers de tonnes la production annuelle des NP manufacturées en 2007. En dépit des effets désirés de ces matériaux, des conséquences imprévues sur l'environnement et la santé sont à prendre en compte, puisque leur rejet dans l'environnement semble inévitable face à la multitude de leurs applications.

1.3. …mais avec des retombées potentielles sur la santé et l'environnement

Additifs alimentaires, crèmes solaires, peintures, produits pharmaceutiques, technologies sans fil et autres exemples témoignent de l'utilisation grandissante des nanoparticules dans notre vie quotidienne. Que leur émission dans l'environnement soit intentionnelle ou non, les nanoparticules vont inéluctablement se déposer au sol ou à la surface de l'eau. Celles atteignant le sol peuvent ainsi le contaminer et migrer à travers jusqu'aux eaux souterraines. De même, les NP des déchets solides ou des effluents d'eaux usées peuvent être transportées vers les systèmes aquatiques par le vent ou le ruissellement (Ray *et al.*, 2009). De plus, les NP manufacturées peuvent être considérées comme des contaminants émergents[1]. La recherche de l'éventuelle « nanotoxicité » gagne ainsi de l'ampleur, tant vis-à-vis de la santé humaine que de l'environnement.

Toute évaluation des risques liés à une substance chimique s'appuie à la fois sur les dangers qu'elle représente pour la santé et l'environnement et sur ses niveaux et durées d'exposition. A ce jour, les stratégies et outils de mesure pour quantifier l'exposition aux nanoparticules ne font pas encore l'objet d'un consensus au niveau national et international, même si des efforts sont faits dans ce sens (ANSES, 2014). Certaines techniques de mesure demeurent par ailleurs complexes, onéreuses et peu répandues. Malgré une volonté de caractériser l'exposition tant des professionnels (salariés amenés à fabriquer ou utiliser des nanoparticules dans les entreprises et les laboratoires de recherche) que de la population générale, la traçabilité des NP

[1] Contaminant dits « émergents » (ou contaminant d'intérêt émergent) : contaminants pour lesquels l'évaluation des risques qui leur sont potentiellement associés n'a pas encore été suffisamment murie pour justifier de leur intégration dans des dispositions règlementaires ; en particulier, leur présence n'est pas surveillée de façon pérenne dans les milieux (d'après la définition proposée par l'Agence française pour la biodiversité, 2017)

tout au long de leur cycle de vie (de leur conception jusqu'à leur recyclage ou leur traitement en tant que déchets) pose généralement problème. Qui plus est, le devenir des NP dans l'environnement, c'est-à-dire leur répartition, leur état de dispersion, leur biodégradabilité, l'identification de leur éventuels produits de dégradation, leur potentiel de bioaccumulation ou encore leur cinétique d'adsorption/désorption sont autant d'éléments qui complexifient leur analyse (OCDE, 2010a). D'autre part, compte tenu du large éventail de NP existantes, dont les caractéristiques varient non seulement par rapport à leur équivalent macroscopique, mais aussi d'un type de NP à un autre, et même d'une forme de NP à une autre, il n'est pas possible d'identifier « un » danger associé à ces particules prises dans leur ensemble. Remarquant l'importance de la variabilité des paramètres physico-chimiques des NP sur leurs effets toxico- et écotoxicologiques, un groupe de travail de l'OCDE, le WPMN (Working Party on Manufactured NanoMaterials), précise certains paramètres critiques à définir pour évaluer la dangerosité spécifique des NP (OCDE, 2010a). Par exemple, il est question de l'état d'agrégation / d'agglomération des NP, de leur distribution de taille, de leur surface spécifique, de leur potentiel Zeta (charge de surface), ou encore de leur coefficient de partage octanol-eau. La solubilité des NP dans l'eau est aussi prise en compte et, comme l'indique l'Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail (IRSST), dans le cas de nanoparticules solubles, la toxicité est d'origine purement chimique après dissolution, tandis que la taille initiale importe peu (IRSST, 2008). Par ailleurs, la norme ISO / TR 13014 :2012 (qui décrit les propriétés physico-chimiques pertinentes des nano-objets nécessaires à une évaluation des risques) souligne également l'importance de ne pas se baser sur les caractéristiques commerciales indiquées par les fournisseurs. En effet, les impuretés contenues dans les nanomatériaux n'y sont pas indiquées, alors qu'elles peuvent être la principale cause d'effets néfastes. Néanmoins, bien que la communauté scientifique semble s'accorder sur le fait que parmi les facteurs physico-chimiques évoqués, plusieurs contribuent à la toxicité des NP, pondérer leur importance respective ou prédire avec précision la toxicité d'une nouvelle NP reste actuellement impossible dans la plupart des cas.

Les connaissances actuellement disponibles sur la toxicité[1] et l'écotoxicité[2] des nanoparticules se sont enrichies ces dernières années, bien qu'elles soient encore relativement fragmentaires.

---

[1] Le terme toxicologie (du grec « toxicon » : le poison) désigne la science qui étudie la toxicité (capacité d'une substance à provoquer des effets nocifs sur le vivant) de substances à différentes échelles, allant de la molécule à l'organisme.

[2] Le terme écotoxicologie (du grec « toxicon » : le poison, et « oikos » : l'habitat) fait référence à une branche de la toxicologie étudiant spécifiquement les effets de polluants d'origine naturelle ou anthropique sur les populations et communautés naturelles (plantes, microorganismes, animaux) de différents écosystèmes. C'est une science

Parmi les différentes voies d'exposition chez l'Homme par exemple, l'inhalation est celle qui s'est prêtée au plus grand nombre de recherches, tandis que la toxicité par ingestion ou contact cutané a beaucoup moins été explorée. Majoritairement, ce sont des études *in vitro* qui constituent l'essentiel de la recherche, même si les études *in vivo* permettent d'apporter des conclusions plus réalistes. Néanmoins, les études portant sur la biodistribution et la biocompatibilité des NP dans l'organisme se sont multipliées, en particulier sur les modèles animaux comme la souris ou le rat (Pradal *et al.*, 2016; K. Yang *et al.*, 2013). Faisant écho aux recommandations du WPMN et de l'ISO / TR 13014 :2012 pour évaluer la toxicité des nanoparticules, des études de biocinétique ont démontré que la persistance des NP dans l'organisme pouvait varier en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (dont des exemples sont illustrés par la Figure 2), puisque ces dernières conditionneraient le passage des barrières biologiques (Mohamed *et al.*, 2012; Monopoli *et al.*, 2012; Rauch *et al.*, 2013). Ainsi, de plus en plus d'études (éco)toxicologiques prennent en compte non seulement les propriétés intrinsèques des NP mais aussi celles qu'elles acquièrent en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent (milieu environnemental complexe organique/inorganique, ou fluide biologique par exemple) (Fraga *et al.*, 2013; Leite-silva *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013).

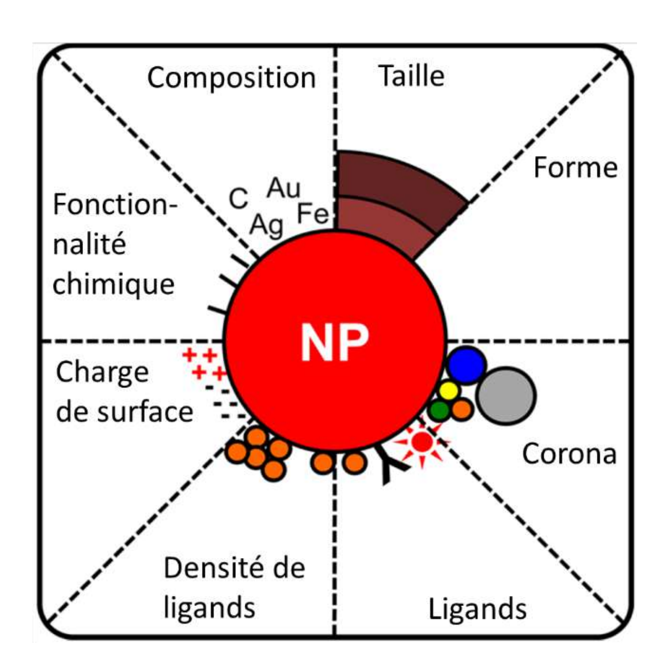


Figure 2. Paramètres physico-chimiques influençant l'absorption cellulaire des nanoparticules (NP) (d'après Rauch *et al.* 2013). Corona : couronne de protéines et de lipides qui enveloppe, même partiellement, les nanoparticules.

---

interdisciplinaire se situant au carrefour entre l'écologie, la chimie de l'environnement, ou encore la physiologie. Définie par François Ramade comme « la science dont l'objet est l'étude des polluants toxiques dans les écosystèmes et même la biosphère toute entière » (Ramade, 2007), l'écotoxicologie se distingue de la toxicologie environnementale, quant à elle davantage inféodée aux niveaux plus inférieurs d'organisation biologique (molécule, cellule, organe, voire individu isolé).

Bien que certains résultats puissent être critiquables en raison du mode d'administration ou de doses peu réalistes des NP, il s'avère que nombre d'entre elles sont capables d'induire des effets toxiques vis-à-vis du vivant. Pour citer quelques exemples parmi tant d'autres, il a notamment été montré que les nanoparticules de TiO_2 étaient responsables d'effets antibactériens associés à des taux cellulaires élevés d'espèces réactives de l'oxygène et de malondialdéhyde (Lin *et al.*, 2014), ou encore qu'elles causaient de la toxicité aiguë et chronique (retard de croissance et mortalité) chez des organismes aquatiques comme la daphnie (Zhu *et al.*, 2010). D'autres NP métalliques comme l'oxyde de cérium ont également entrainé des effets toxiques sur la croissance des vers de terre (Arnold *et al.*, 2013), ou encore des perturbations moléculaires lors de la photosynthèse et de la fixation du carbone chez une algue verte (Taylor *et al.*, 2016). De plus, les nanoparticules d'argent peuvent par exemple affecter le développement des embryons ou encore causer des aberrations chromosomiques et des dommages à l'ADN chez le poisson zèbre (Wijnhoven *et al.*, 2009). Alors que l'or est inerte à l'échelle macroscopique, les nanoparticules d'or peuvent quant à elles être cytotoxiques en présence d'agents d'enrobage (S. Wang *et al.*, 2008). Par ailleurs, des nanoparticules de plastique sont connues pour s'accumuler dans les organes et cellules de diverses espèces, tout en stimulant l'inflammation, la production d'espèces réactives de l'oxygène, des défauts de développement, ou encore en induisant de la mortalité (Koelmans *et al.*, 2015). D'autre part, certaines NP de carbone comme les nanotubes ont manifesté de la cytotoxicité *in vitro*, incluant l'induction de stress oxydatif, l'inhibition de prolifération cellulaire et l'induction d'apoptose ou nécrose (Lam *et al.*, 2006; Shvedova *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2006). Ces particules carbonées, également capables de pénétration pulmonaire, feraient même écho aux effets cancérogènes de l'amiante, en raison de leur ressemblance structurelle (Jia *et al.*, 2005).

Du fait de leur potentiel toxique, l'utilisation des NP manufacturées soulève certaines interrogations éthiques. Née aux Etats-Unis dans les années 2000, cette réflexion éthique autour des implications sociétales des nanotechnologies discute des incertitudes relatives à leurs avantages et inconvénients, mais aussi du problème de leurs applications dans certains domaines sensibles comme la médecine, l'alimentation, ou encore leur implication dans le projet transhumaniste[1]. Pour ce qui est de leur définition et de leur statut, les nanotechnologies se livrent également à d'autres questions : posent-elles des problèmes éthiques inédits ? Ou ne

[1] Le transhumanisme est un mouvement d'origine américaine prônant l'usage des sciences et des techniques dans le but de l'amélioration des caractéristiques physiques et mentales des êtres humains. Les nanotechnologies y ont été associées dans l'optique de l'« amélioration humaine ».

fait-on que reposer sous une autre forme des problèmes classiques déjà rencontrés à l'occasion d'autres types de technologie ? Qui doit être responsable de l'identification et de la résolution des problèmes éthiques liés aux nanotechnologies ? Plusieurs positions se défendent, avec l'idée de confier cette tâche soit à des experts en éthique, soit aux scientifiques, soit au grand public –bien que celui-ci soit bien peu armé pour exercer cette responsabilité selon l'ANSES (2014). Globalement, s'exprime dans la société civile l'idée que le développement des nanomatériaux doit se faire avec prudence, invoquant généralement le principe de précaution[1] et l'équilibre risques/bénéfices. Ainsi, l'ensemble des parties prenantes (industriels, syndicats, associations, etc.) s'accorde généralement sur la nécessité d'une règlementation applicable aux nanomatériaux manufacturés.

1.4. Cadre législatif des nanomatériaux

Malgré une augmentation du nombre d'études toxico- et écotoxicologiques, les connaissances actuelles sont encore lacunaires, ce qui contribue à rendre difficile la mise en place d'un cadre législatif pour tout ce qui a trait aux nanoparticules. Effectivement, les textes règlementaires concernant les NP semblent encore limités en nombre et en portée à ce jour, même si leur progression n'est pas négligeable sur la dernière décennie. Adopté en 2006, le règlement européen REACH[2] vise à recenser, évaluer et contrôler les substances chimiques (fabriquées ou importées, existantes ou nouvelles) mises sur le marché européen, en vue d'améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement. Plus spécifiquement, le règlement n°1907/2006 vise à progressivement supprimer les substances chimiques les plus dangereuses dans l'Union Européenne. Néanmoins, REACH n'inclue pas explicitement les nanoparticules, bien que celles-ci répondent à la définition des substances décrites et que les mêmes dispositions y soient applicables, selon l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA, 2014). De même, l'Agence américaine de protection de l'environnement (US EPA[3]) appréhende les nanomatériaux selon la nouveauté de leur « identité moléculaire » (US EPA, 2008). Autrement

[1] Le principe de précaution est énoncé par la loi n°95-101 du 2 février 1995 (dite loi Barnier) de la façon suivante : « l'absence d certitudes, compte tenu des connaissances scientifiques et techniques du moment, ne doit pas retarder l'adoption de mesures effectives et proportionnées visant à prévenir un risque de dommages graves et irréversibles à l'environnement à un coût économique acceptable ».

[2] REACH : de l'anglais « Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of CHemicals » (Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques) : enregistrement de toutes les substances chimiques fabriquées ou importées sur le marché européen (tonnage > 1 t/an) d'ici 2018 ; évaluation des propositions d'essais, des dossiers d'enregistrement et des substances ; autorisation pour les substances chimiques extrêmement préoccupantes.

[3] US EPA : de l'anglais « United States Environmental Protection Agency » (Agence américaine de protection de l'environnement) : agence du gouvernement des Etats-Unis créée en 1970 pour protéger la santé humaine et sauvegarder les éléments naturels (l'air, l'eau et la terre) essentiels à la vie.

dit, si un nanomatériau s'apparente à un produit ayant la même identité moléculaire, il n'est pas considéré comme nouveau et dépend alors de la règlementation en vigueur pour son équivalent non-nanométrique. Aussi, en 2011, la Commission Européenne a publié une recommandation spéciale sur la définition des nanomatériaux, qui doit être utilisée dans les règlements européens comme REACH et CLP[1] (Classification, Labelling, Packaging ; règlement CE n°1272/2008). Afin de fournir aux industriels des outils pour appuyer l'évaluation de la sécurité chimique des nanomatériaux et soutenir l'application du règlement REACH, un consortium international, REACHnano, a également été créé en 2012. Il vise notamment à inclure les nanomatériaux dans le règlement REACH comme un groupe à part entière. Parallèlement, l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) a établi une liste prioritaire des nanomatériaux à évaluer au niveau européen (OCDE, 2010a), liste accompagnée d'instructions mises à disposition des industriels et des scientifiques pour évaluer les risques liés aux nanomatériaux à l'aide de tests (OCDE, 2010b). L'OCDE a également mis en place un groupe de travail sur lequel elle s'appuie pour estimer la pertinence de ses propres méthodes d'évaluation du risque : le SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risk). Ce comité scientifique avait notamment relevé que les nanoparticules n'induisaient pas toutes de toxicité plus forte que leur équivalent non-nanométrique, préconisant ainsi une règlementation au cas par cas des différentes NP (SCENIHR, 2007). De plus, le SCENIHR soulevait également dans ce même rapport la question de l'unité employée pour caractériser la concentration d'une nanoparticule et son effet-dose, puisque la concentration massique n'est pas nécessairement le meilleur descripteur de dose pour ces matériaux et que la concentration exprimée en nombre de particules ou en surface serait plus appropriée. Néanmoins, bien que l'on puisse généralement identifier le danger lié aux nanoparticules, l'absence de données suffisantes quant à leur devenir et à leurs effets sur l'environnement ne permet pas encore de proposer de règles fondées pour évaluer les risques y étant associés.

En France, la déclaration des usages des substances à l'état nanoparticulaire ainsi que les quantités annuelles produites, importées et distribuées sur le territoire français est obligatoire depuis janvier 2013, conformément aux articles L. 523-1 à L. 523-8 du Code de l'environnement. La première déclaration (portant sur les données de l'année précédente) fait

[1] CLP : de l'anglais « Classification, Labelling, Packaging » (Classification, étiquetage, emballage) : règlement visant à assurer que les dangers présentés par les substances chimiques soient clairement communiqués aux travailleurs et aux consommateurs de l'Union européenne grâce à la classification et à l'étiquetage des produits chimiques.

état de 500 000 tonnes de substances à l'état nanoparticulaire mises sur le marché en France (Ministère de l'Ecologie du Développement durable et de l'Energie, 2013). Les déclarations ultérieures rapportent une augmentation de la production des substances nanoparticulaires sur le territoire au détriment de leur importation, pour une quantité totale mise sur le marché sensiblement identique (Ministère de l'Ecologie du Développement durable et de l'Energie, 2016). L'ANSES souligne l'interrogation quant à l'absence de déclaration de certains nanomatériaux manufacturés, comme par exemple les nanoparticules d'argent ou bien certains nanocarbones, qui sont par ailleurs connus et identifiés par la communauté scientifique (ANSES, 2014). De plus, il serait important d'analyser les NP de surface chimiquement modifiée (par réaction covalente) ou présentant un revêtement de surface modifié (par apport d'agents adsorbants par exemple) par rapport à la NP d'origine. Une amélioration du dispositif de déclaration semble nécessaire afin d'identifier de manière certaine les nanoparticules manufacturées produites, distribuées et importées sur le territoire national.

Au sein des nombreux types de NP manufacturées existantes, ce sont les nanoparticules de carbone (NPC) qui font l'objet de ce manuscrit.

2. Le cas des nanoparticules de carbone

2.1. Les allotropes du carbone

Le carbone, élément chimique de numéro atomique 6, constitue environ 0,9 % (en masse) de la lithosphère et de l'hydrosphère réunies. Présent dans de nombreux composés naturels -gaz carbonique de l'atmosphère, roches calcaires, combustibles (gaz, pétrole, charbon minéraux)- c'est aussi un constituant fondamental de la matière vivante (Brusset et Amiel, 2017). A la base de la chimie organique, le carbone peut s'associer à d'autres éléments et ainsi constituer plus de 95 % des composés chimiques connus. Bien que d'autres éléments puissent se lier entre eux, aucun n'équivaut le carbone dans sa capacité à former de longues structures semblables à des chaînes par le biais d'une série de liaisons covalentes (Falcao et Wudl, 2007). Il peut non seulement se lier à d'autres éléments, mais aussi à lui-même. Illustrant ce pouvoir de caténation[1], le diamant et le graphite sont deux exemples de matériaux exclusivement constitués d'atomes de carbone. Ils sont considérés comme les formes allotropiques principales (différents assemblages d'un même élément chimique) de cet élément. Bien qu'il n'ait pas de structure cristalline et qu'il contienne des taux significatifs d'hydrogène, le carbone amorphe est

[1] Caténation : aptitude d'un élément chimique à former une longue structure semblable à une chaine par le biais d'une série de liaisons covalentes.

également considéré comme un allotrope du carbone, à l'instar du noir de carbone (CB, en anglais « carbon black). D'autres formes allotropiques incluent les fullerènes[1], les nanotubes, ou encore le graphène (cristal bidimensionnel monoplan de carbone dont l'empilement constitue le graphite) (Figure 3).

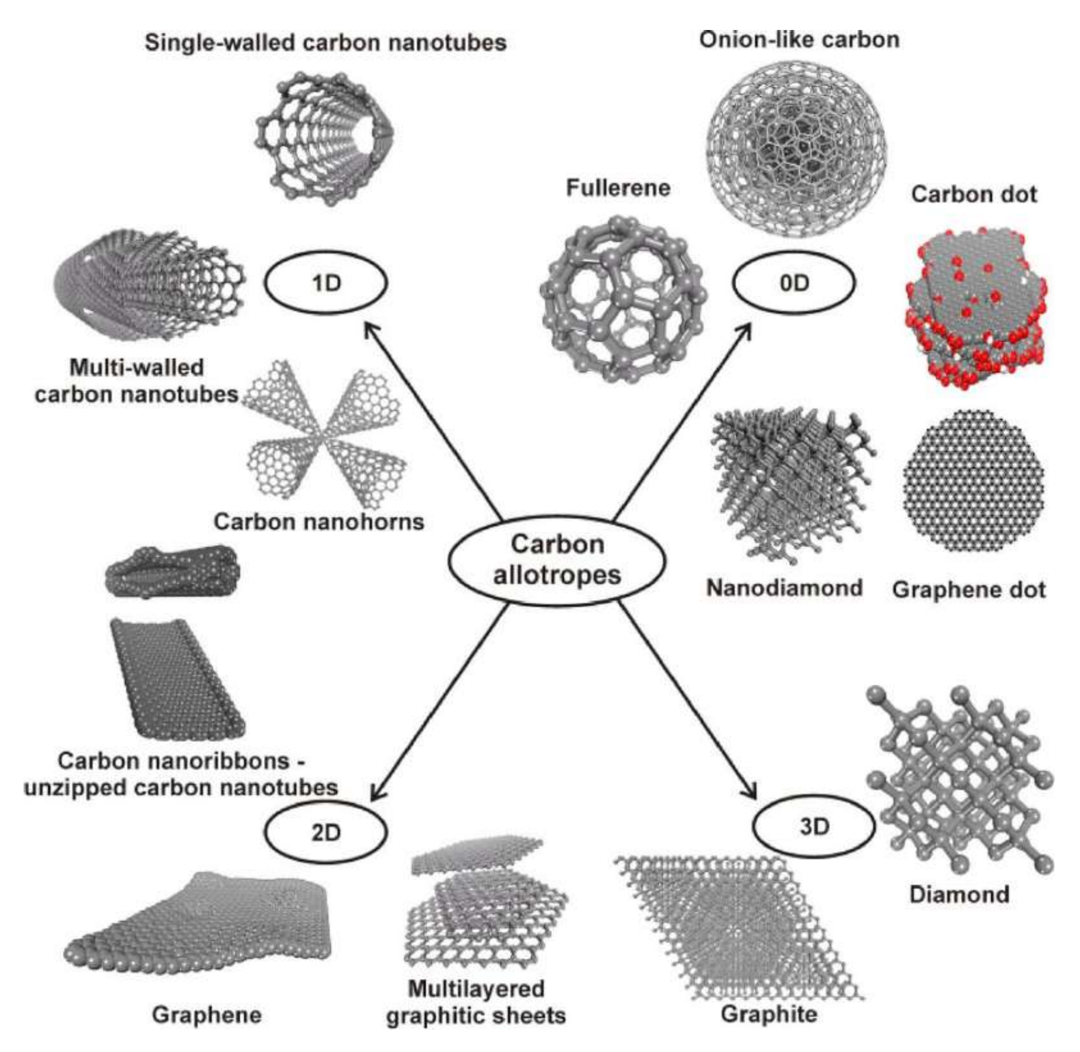


Figure 3. Classification des allotropes du carbone d'après leur dimensionnement (d'après Georgakilas *et al.* 2015).

Ces différentes formes carbonées peuvent se former naturellement -à faibles quantités- sous l'effet de certaines conditions de pression et température, ou encore *via* l'action de la foudre, lors d'éruptions volcaniques ou d'incendies. L'existence de gisements de graphite et de diamant (Asselborn *et al.*, 2006), ou encore la présence de fullerènes et de nanotubes de carbone retrouvés dans des carottes de glace âgées de 10000 ans atteste de ces phénomènes (Murr *et al.*, 2004). Des nanoparticules de carbone peuvent aussi être produites de manière involontaire par l'activité humaine par combustion de gaz naturel ou de propane *via* les brûleurs des plaques de

[1] Fullerènes : molécules nanoparticulaires possédant au minimum 60 atomes de carbone (C60) formant une cage fermée d'épaisseur monoatomique dont la structure rappelle celle d'un ballon de football.

cuisson, les fours industriels, les chauffe-eaux et les centrales électriques (Murr *et al.*, 2004). A l'heure actuelle, les NPC font aussi l'objet d'une production volontaire à grande échelle. Ce sont ces dernières, dits manufacturées, que ce manuscrit s'attachera à étudier. Plus particulièrement, l'accent sera essentiellement mis sur les matériaux de la famille du graphène, mais aussi sur les nanotubes de carbones, et dans une moindre mesure, sur les nanodiamants et le noir de carbone.

Pourtant déjà observées pour la plupart dès le milieu du XXème siècle, les NPC sont longtemps restées méconnues. Ce n'est que dans les années 1990, parallèlement à un contexte économique favorable, qu'a lieu une prise de conscience de leur potentiel technologique. Les premières synthèses contrôlées de nanotubes de carbone ont commencé à cette époque, suite à leur observation en microscopie électronique à transmission dans les suies issues d'une synthèse de fullerènes par arc électrique (Iijima, 1991). De même, un regain d'intérêt pour les nanodiamants s'est manifesté, alors que leur première production (par détonation) remontait aux années 1960 (Danilenko, 2004). Le noir de carbone, quant à lui synthétisé par combustion depuis des siècles pour servir de pigment, a également été reconsidéré ces dernières décennies. Plus récemment, le graphène a été isolé en 2004 par Andre Geim et Konstantin Novoselov (Novoselov *et al.*, 2004), ce qui leur a valu le prix Nobel de physique en 2010. La production de ces NPC s'est donc intensifiée au niveau mondial, principalement en Asie, aux Etas-Unis et en Europe. Estimé à 2,26 billions de dollars en 2015, il est prévu que le marché mondial des nanotubes de carbone atteigne 5,64 billions en 2020, avec un taux annuel de croissance de 20,1 % (MarketsAndMarkets, 2015a). Par comparaison, le marché mondial du graphène est censé atteindre 278,47 millions de dollars en 2020, avec une progression annuelle de l'ordre de 40 % (MarketsAndMarkets, 2015b). Le noir de carbone quant à lui devrait atteindre un marché de 13,79 billion de dollars en 2021, avec une croissance annuelle de 4,6 % (MarketsAndMarkets, 2017). Conjointement aux coûts que représente le marché des NPC, leur taux de production -en tonnage- doit être pris en compte, puisque de ce rendement dépend le prix. Les capacités de production augmentant, les nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT, pour « multi-walled carbon nanotubes » en anglais) peuvent aujourd'hui être produits à l'échelle industrielle avec un niveau de pureté élevé, abaissant leur coût à 0,10-0,15 €/g (en 2014) selon la qualité recherchée. Au contraire, le prix des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNT) de haute pureté avoisine les 100 €/g (Werner *et al.*, 2014). Le graphène a tendance à devenir lui aussi de plus en plus abordable : certains fournisseurs donnaient des prix inférieurs à 0,1 $/g en 2016, tandis que le marché mondial devrait représenter 3800 tonnes/an en 2026 (Ghaffarzadeh, 2016).

A l'heure actuelle, de nombreux domaines d'activité ont déjà recours aux NPC, tandis qu'une multitude d'autres applications sont encore à l'étude. Le Tableau 2 présente quelques exemples de ces applications actuelles et futures.

Tableau 2. Applications actuelles et futures du graphène (Georgakilas *et al.*, 2015; Guo et Mei, 2014), des nanotubes de carbone (Ajayan et Zhou, 2001; De Volder *et al.*, 2013; Endo *et al.*, 2008; Upadhyayula et Gadhamshetty, 2010), du nanodiamant (Georgakilas *et al.*, 2015; Mochalin *et al.*, 2012) et du noir de carbone (International Carbon Black Association, 2016a).

Allotropes de carbone	Secteurs d'activité	Exemples d'applications actuelles et futures
Graphène	**Energie**	Plaques conductrices dans les supercondensateurs, batteries au lithium se rechargeant plus vite, stockage d'hydrogène pour les nouvelles piles à combustible, remplacement des catalyseurs de platine par des catalyseurs moins chers, etc.
	Santé	Traitement photothermique du cancer, transport ciblé de médicaments, biodétection, détection de neurotransmetteurs, diagnostic médical, imagerie cellulaire et tumorale, adsorption d'enzymes, etc.
	Environ-nement	Purification de l'eau, activité antimicrobienne, détecteurs de contamination dans l'eau et la nourriture, désalinisation de l'eau, détection de vapeurs chimiques, etc.
	Matériaux composites	Résistance et renforcement mécanique des matériaux (résines époxy, pales d'éoliennes, composants d'aéronef, etc.), etc.
	Electronique	Ecrans solides, légers, fins et flexibles, transistors photosensibles, balistiques, à rotation de spin, nouveaux dispositifs électrochromiques, électrodes pour afficheur à cristaux liquides, cellules photovoltaïques organiques de nouvelle génération, nouvelles diodes électroluminescentes organiques (remplacement de l'indium et recyclage facilité), etc.
	Autres	Composants de modulateurs optiques, emballages alimentaires, membranes de séparation des gaz, etc.
Nanotubes de carbone	**Energie**	Condensateurs stockant de plus grandes quantités d'énergie, nouveaux types de batteries, électro-catalyse dans les piles à combustible, nanoélectrodes, etc.
	Santé	Détecteurs de protéines impliquées dans le cancer, transport ciblé de médicaments, chirurgie non invasive, amélioration du processus de guérison des os, imagerie de haute résolution, etc.
	Environ-nement	Filtres à polluants organiques et métalliques dans la purification de l'eau, abaissement du coût énergétique dans les processus de désalinisation, détecteurs de vapeurs chimiques, de bactéries ou d'aliments avariés, etc.

	Electronique	Ecrans plats, transistors, semi-conducteurs, dispositifs à émission de champ d'électrons, dispositifs de protection contre les fluctuations de tension, protection contre les champs électromagnétiques, etc.
	Matériaux composites	Résistance et renforcement mécanique des matériaux, matériel sportif (raquettes de tennis, cadres de vélo, etc.), supports de synthèse de nanostructures, etc.
	Autres	Coques de bateaux, voilure d'avion, aéronefs, navettes spatiales, revêtements, allègements, équipements militaires, etc.
Nano-diamant	**Energie, chimie**	Stockage énergétique, constituants pour batteries, activité catalytique, électrolyse de métaux, activité redox dans les systèmes électrochimiques, etc.
	Santé	Administration ciblée de médicaments, mimétisme protéique, médecine régénératrice de tissus endommagés et implants chirurgicaux, etc.
	Tribologie[1] et lubrification	Augmentation de la durée de vie des moteurs et diminution de la consommation de carburant par réduction de la friction,
	Matériaux composites	Amélioration de la résistance mécanique, de la résistance à l'abrasion, de l'adhésion, de la protection électromagnétique, de la conductivité thermique, etc.
	Autres	Imagerie par résonnance magnétique, chromatographie, protéomique et spectrométrie de masse, déposition chimique en phase vapeur, etc.
Noir de carbone	**Matériaux composites**	Renforcement des pneus et du caoutchouc industriel, en particulier dans le domaine automobile (joints flexibles, isolation vibratoire, ressorts pneumatiques, pare-chocs, etc.), inclusion dans les plastiques d'emballage pour le conditionnement antistatique, etc.
	Autres	Agents de surface pour la pigmentation, la conductivité, la protection anti-UV, etc.

2.2. Structure et propriétés

Les applications des NPC découlent de leurs propriétés, qui découlent elles-mêmes de leurs caractéristiques, incluant leur structure. Sur la base de leurs liaisons C-C, deux grands types de structures nanocarbonées se distinguent. Le premier groupe implique des nanostructures graphéniques, principalement constituées de carbone sp^2 organisé en cristal de nid d'abeille,

[1] Tribologie : science qui étudie les phénomènes susceptibles de se produire entre deux systèmes matériels en contact, immobiles ou animés de mouvements relatifs.

bien que certains atomes de carbone sp^3 puissent exister sur les bords ou sur les zones présentant des défauts. Les nanoallotropes graphéniques reposent sur la capacité du carbone à former trois liaisons covalentes identiques avec d'autres atomes de carbone en utilisant les orbitales sp^2, formant ainsi un réseau d'hexagones bidimensionnel. Le représentant par excellence de ce groupe n'est autre que le graphène lui-même, un unique feuillet bidimensionnel d'atomes de carbone sp^2. Dans un feuillet de graphène, les atomes de carbone sont liés entre eux par liaison covalente σ, faisant de ce matériau le plus solide connu (Lee *et al.*, 2008). De plus, chaque atome de carbone présente des orbitales π, perpendiculaires au plan du feuillet, qui sont responsables de la conduction d'électrons (Figure 4).

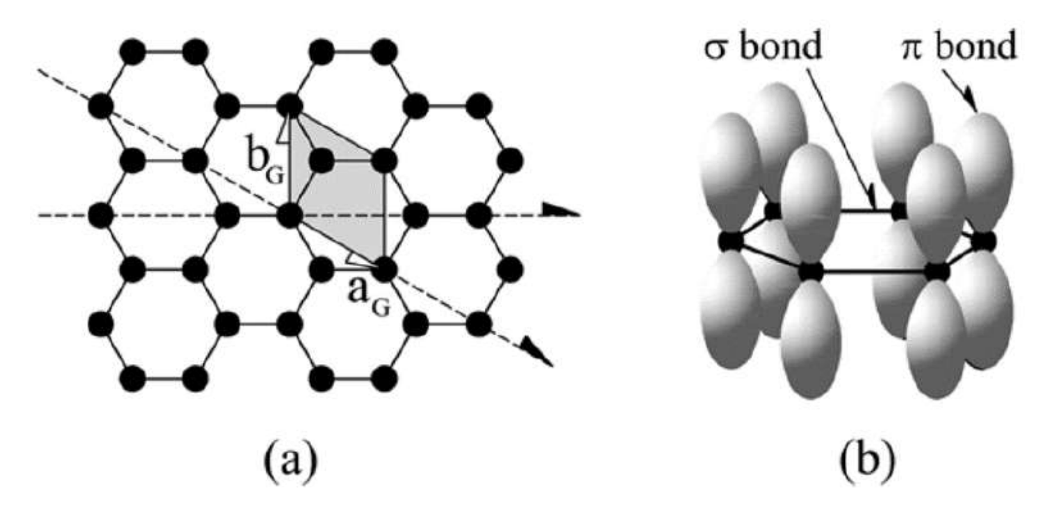


Figure 4. (a) Structure hexagonale du graphène. Les directions « zigzag » et « armchair » (chaise) sont montrées par les vecteurs a_G et b_G, respectivement. La partie grisée représente l'unité permettant de définir la densité de surface du carbone à 3,820 atomes.$Å^{-2}$. (b) Représentation schématique des liaisons σ dans le plan du feuillet de carbone et des orbitales π perpendiculaires à ce plan (d'après Hass, De Heer, & Conrad 2008).

La structure planaire de ces atomes de carbone peut se fléchir relativement facilement sans se rompre, ce qui donne au graphène un caractère à la fois rigide et flexible, tout en étant fin et léger. Mais encore, le graphène est un excellent conducteur thermique, et également un excellent conducteur électrique. Sa structure plane offre peu de résistance au transfert des électrons, réduisant considérablement la perte d'énergie dans les applications électroniques actuelles et futures. Selon les conditions, il peut aussi se comporter comme un semi-conducteur, d'où son application dans les transistors. En outre, sa faible épaisseur (feuillet monoatomique) fait de lui un film presque totalement transparent qui transmet 97,5 % de la lumière le traversant, ce qui, combiné à ses autres propriétés, le recommande tout à fait pour les écrans tactiles ou les panneaux solaires (Nair *et al.*, 2008). Cependant, la transmission lumineuse décroit rapidement lorsque le nombre de feuillets de graphène augmente, ceux-ci pouvant s'empiler. De même, la structure électronique évolue rapidement avec le nombre de couches. Ceci peut s'expliquer par

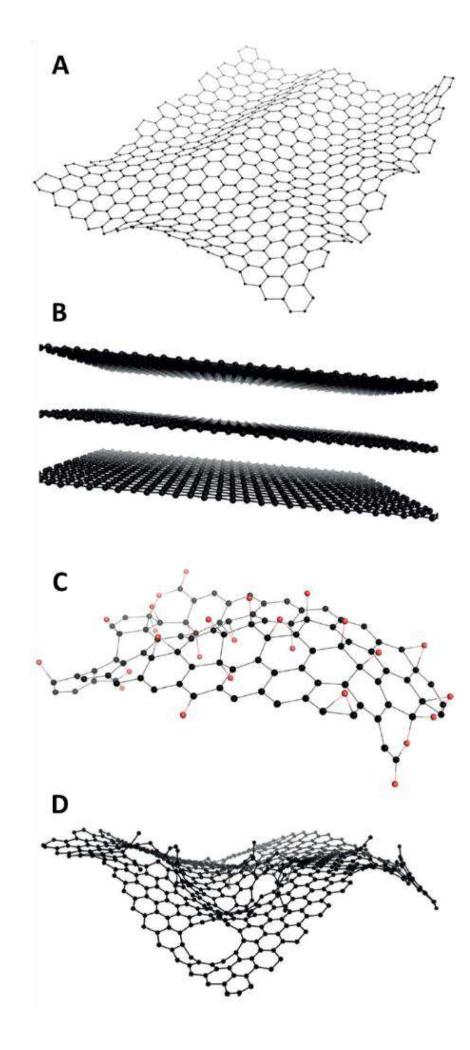


Figure 5. Représentation schématique des structures de certains membres des GFM : (A) graphène, (B) FLG (few-layer graphene), (C) oxyde de graphène (avec les atomes d'oxygène en rouge) et (D) oxyde de graphène réduit (d'après Bianco, 2013).

le fait que les orbitales π, perpendiculaires au plan du (des) feuillet(s), et rendant possible la conduction d'électrons, permettent des interactions entre les couches de graphène (Hass *et al.*, 2008). Ainsi, les « graphènes » mono-, double- et multi-feuillets (3 à 9 couches) se distinguent comme trois types de cristaux 2D. Au-delà de 10 couches, les structures en question peuvent être considérées comme des films fins de graphite (Geim et Novoselov, 2007; Novoselov *et al.*, 2004; Partoens et Peeters, 2006). Notons que par abus de langage, il est souvent fait mention de « graphène » pour désigner non seulement le graphène au sens strict (mono-feuillet) mais aussi les nanomatériaux dont il constitue l'élément de base (GFM, pour « graphene family nanomaterials » en anglais), comportant plusieurs feuillets d'atomes de carbone, ou encore étant chimiquement fonctionnalisés, comme illustré par la Figure 5.

Théoriquement, le graphène peut être vu comme le composant de base des autres nanoallotropes graphéniques. Il peut par exemple s'empiler sur lui-même comme cela vient d'être mentionné, mais il peut aussi être enveloppé sur lui-même pour former du fullerène, ou enroulé sur lui-même pour former des nanotubes de carbone (Geim et Novoselov, 2007). Les nanotubes de carbone (NTC) désignent une vaste gamme de nanostructures cylindriques, idéalement basées sur un réseau hexagonal de carbone sp^2 comme le graphène. La forme la plus simple de NTC présente une unique paroi graphénique, fermée à ces deux extrémités. Ces NTC mono-paroi (SWCNT, pour « single-walled carbon nanotubes » en anglais) sont des cylindres creux avec un diamètre de l'ordre de 0,4-2 nm et mesurent plusieurs micromètres de long. Les NTC peuvent aussi présenter une paroi double (DWCNT, pour « double-walled carbon nanotubes » en anglais) ou multiple (MWCNT). Le rapport longueur/diamètre des NTC dépasse fréquemment 10 000, ce qui fait des NTC des matériaux particulièrement anisotropes[1]. En dehors de leur diamètre et de

[1] Anisotrope : se dit d'un corps dont les propriétés physiques varient suivant la direction. Par exemple, des lunettes de soleil polarisantes ne laissent pas passer la lumière selon la direction dans laquelle on les regarde. Ou encore,

leur longueur, la chiralité (l'angle entre les hexagones et l'axe du nanotube) est un autre paramètre clé des NTC. Autrement dit, les atomes de carbone peuvent s'organiser de différentes façons autour de la circonférence du nanotube (chaise, zigzag, ou autre motif chiral), comme illustré par la Figure 6. Les propriétés des NTC sont largement dépendantes de cette chiralité, à l'instar des nanotubes de formation « armchair » (ou chaise en français) qui sont considérés comme métalliques et dont la conductivité est 10^3 fois supérieure à celle du cuivre. D'autres NTC, de formation en zigzag sont quant à eux semi-conducteurs, tandis que d'autres encore (forme chirale) sont intermédiaires (Aqel *et al.*, 2012; Ávila et Lacerda, 2008; Sisto *et al.*, 2016). Enfin, le nombre de parois des nanotubes conditionne leur surface spécifique (elle diminue lorsque ce nombre augmente). D'une certaine manière, celle-ci est également réduite lorsque les NTC s'agglomèrent entre eux pour former des faisceaux *via* d'importantes forces de Van der Waals (Agnihotri et Rood, 2006; Dai, 2002).

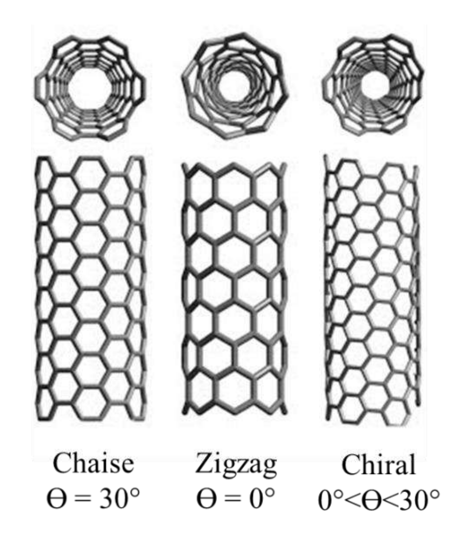


Figure 6. Exemples schématiques de SWCNT montrant différentes chiralités : chaise, zigzag et chiral. : ϴ : angle d'hélicité (d'après Scarselli, Castrucci, and De Crescenzi 2012).

Un second groupe de nanostructures carbonées concerne les particules contenant à la fois des atomes de carbone sp^2 et sp^3 (en proportions variables, ou principalement sp^3) et présentant un mélange de régions amorphes et graphitiques. Les nanodiamants sont actuellement les seuls membres connus de ce groupe (Georgakilas *et al.*, 2015). Leur diamètre est compris entre 1-2 et 20 nm. En-dessous de cette fourchette, ils sont appelés diamantoïdes et les carbones sp^3 de leur surface sont normalement liés à des hydrogènes ou à d'autres atomes que le carbone. Ils ont alors tendance à se comporter comme des molécules organiques. Puis, lorsque leur diamètre

la résistance et la rigidité sont beaucoup plus grandes dans le sens des fibres du corps en question que dans les autres directions. L'anisotropie permet une réduction importante de la quantité de matière et donc du poids, critère vital en aéronautique et dans le domaine spatial (d'après la définition de Futura Sciences).

augmente, la proportion d'atomes de carbone à la surface diminue, et les caractéristiques propres au diamant deviennent importantes -à savoir la semi-conductivité, la résistance mécanique, un indice de réfraction élevé, la conduction thermique, et la résistivité électrique. Au-delà de 20 m de diamètre au contraire, leur comportement se rapproche du diamant à l'échelle non-nanométrique (Williams, 2011).

2.3. Synthèse et purification

2.3.1. Synthèse et purification du graphène

Le graphène peut être synthétisé selon deux approches principales : l'exfoliation mécanique, et les méthodes chimiques dites top-down (exfoliation chimique et réduction d'oxyde de graphène) ou bottom-up (auto-assemblage de précurseurs moléculaires, chauffage d'un cristal de carbure de silicium).

L'exfoliation mécanique est la première méthode à avoir été utilisée pour obtenir du graphène mono- et multi-feuillet (FLG, pour « few layer graphene » en anglais) à l'aide d'une technique de clivage micromécanique (Novoselov *et al.*, 2005, 2004). Brièvement, cette méthode implique un pelage répété du graphite -fixé à une résine photosensible- à l'aide de bandes de scotch. A terme, seules de fines paillettes de graphène (d'épaisseur inférieure à 10 nm) sont laissées sur la résine, avant d'en être libérées au moyen d'une solution d'acétone. Puis, une plaquette de silicium recouverte de SiO_2 est placée dans la solution afin de récupérer le graphène qui vient s'y fixer *via* les forces de Van der Waals. Cette technique permet d'obtenir des cristaux de surface de plus de 100 μm^2 et d'excellente qualité structurale et électrique, en relation directe avec la qualité et la pureté du graphite de départ (Basu *et al.*, 2013). En dépit de son apparente simplicité, cette technique est néanmoins chronophage et demande beaucoup de patience et de précision.

Dans un objectif de meilleurs rendements (sans toutefois atteindre une applicabilité à l'échelle industrielle), cette méthode a donc été amenée à évoluer. Le graphène exfolié peut actuellement être produit en solution, à l'aide d'une ultrasonication[1]. Un des désavantages de cette technique est que le graphène ne peut être dispersé qu'à faible concentration (<0,01 $mg.mL^{-1}$), or la dispersion s'avère nécessaire pour garantir l'efficacité de l'exfoliation. De ce fait, des solvants

[1] Ultrasonication : désigne l'irradiation d'un échantillon liquide par des ondes ultrasonores (>20 kHz) ayant pour conséquence une agitation. La propagation des ondes sonores dans le liquide entraine l'alternation de cycle de haute pression (compression) et de basse pression (raréfaction). Lors de la raréfaction, des ondes sonores de haute intensité créent de petites bulles de vide dans le liquide, qui éclatent ensuite violemment (cavitation) lors de la compression, créant localement de très fortes températures (Royal Society of Chemistry, 2017).

organiques spécifiques de tension de surface d'environ 40 mJ.m^2 sont utilisés, comme le N-méthyl-2-pyrrolidone, les solvants aromatiques perfluorés, le diméthylformamide ou le *o*-dichlorobenzène (Hamilton *et al.*, 2009; Hernandez *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010). Dans certains cas, des molécules de surfactant sont utilisées pour stabiliser le graphène dans les suspensions liquides, comme illustré par la Figure 7 (De *et al.*, 2010; Lotya *et al.*, 2010). La sonication doit être appliquée à faible puissance pour séparer les feuillets de carbone sans pour autant les endommager. Malgré certains défauts qui peuvent être mis en évidence sur les bords du graphène obtenu (mais pas sur le plan des feuillets), ce dernier est considéré de haute qualité (Khan *et al.*, 2010). Cependant, cette technique présente certains inconvénients, incluant la formation simultanée de graphène multi-feuillet et mono-feuillet, et le fait que les produits en question soient de petite taille (dans certains cas, inférieurs à 1 µm). Disposer de larges nanostructures carbonées est ce qui fait l'intérêt du graphène dans plusieurs applications, comme le renforcement mécanique ou l'amélioration de la conductivité de composites à base de polymères (Lyons *et al.*, 2008).

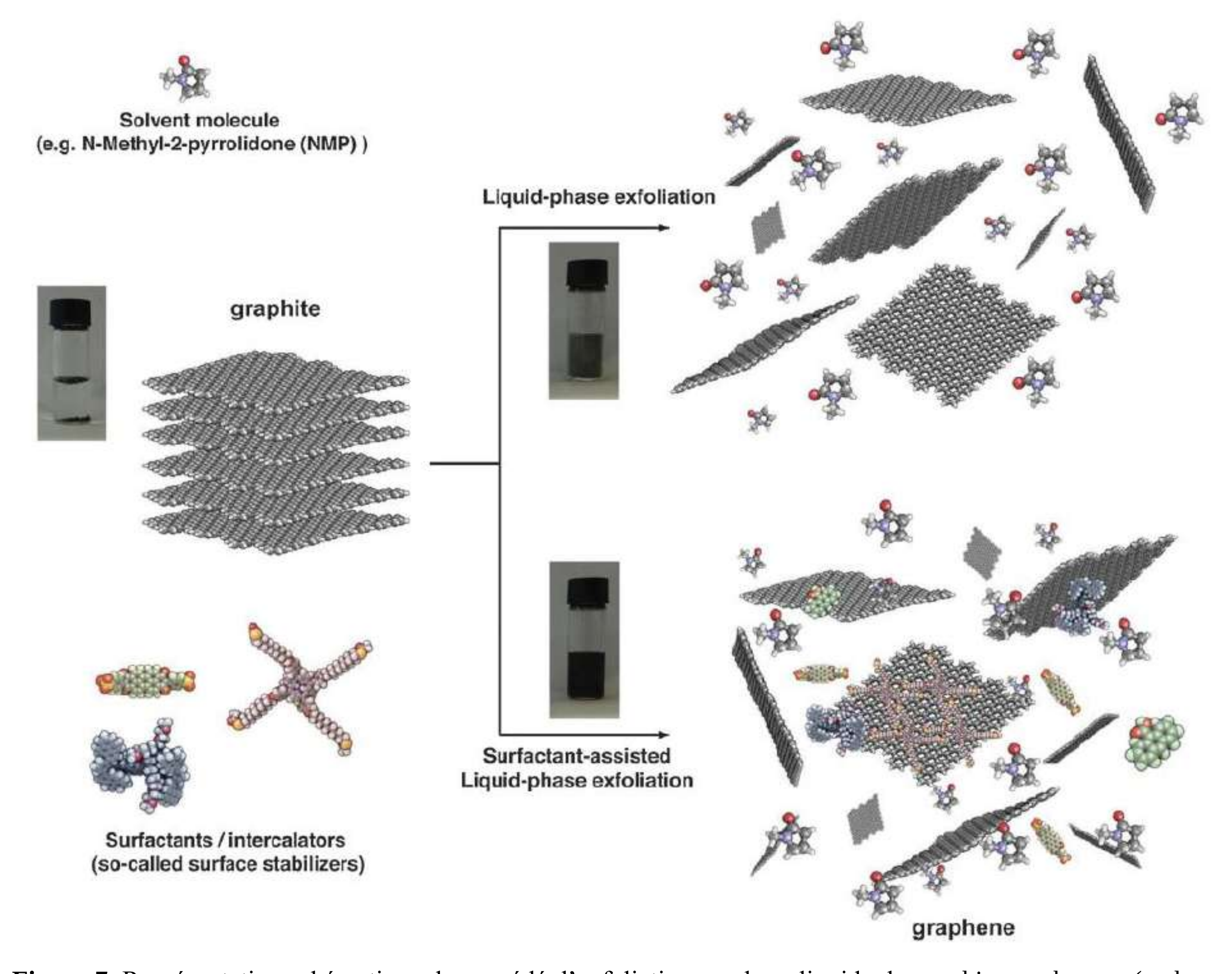


Figure 7. Représentation schématique du procédé d'exfoliation en phase liquide du graphite en absence (en haut à droite) ou en présence (en bas à droite) de molécules de surfactant (d'après Ciesielski & Samori 2014).

De plus, bien que moins répandue, une autre technique permettant d'obtenir du graphène et du FLG peut être réalisée par ablation mécanique de mine de crayon. Un des FLG que nous utilisons est produit par cette méthode, laquelle a l'avantage d'être simple, peu onéreuse, et de ne pas nécessiter de produits chimiques. Son rendement peut atteindre jusqu'à 60 % (en masse) (Janowska *et al.*, 2012). Elle consiste à réduire mécaniquement la mine de crayon sur une surface rêche (verre, quartz ou métal) sous l'action simultanée d'une ultrasonication dans un solvant approprié (éthanol, toluène, eau). Les mines de crayon sont des produits commerciaux consistant en du graphite incorporé dans un liant inorganique maintenant la forme macroscopique de la mine. Aussi, une phase de purification est nécessaire pour éliminer ces résidus inorganiques. Pour cela, la suspension obtenue est filtrée (en cas de solvants organiques) puis traitée par un reflux basique (NaOH, 20 wt.%, 3 h), puis acide (HCl, 5 M, 1 h), avant de subir un lavage, une autre étape de filtration, et enfin d'être séchée. Le produit obtenu est alors placé sous ultrasonication (0,5 h) dans du toluène ou de l'éthanol, puis laissé décanté, permettant de séparer le FLG des résidus non désirés (Janowska *et al.*, 2012).

D'autre part, dans une optique de production à grande échelle, le graphène peut être obtenu à partir de graphène oxydé (GO) (Gomez-Navarro *et al.*, 2007; Tung *et al.*, 2009). Le GO présente l'avantage d'être dispersable dans certains solvants organiques à des concentrations supérieures à 1 $mg.mL^{-1}$ (Lomeda *et al.*, 2008; Stankovich *et al.*, 2007) et dans l'eau à plus de 7 $mg.mL^{-1}$ (Park *et al.*, 2008). Dans cette technique, l'oxydation du graphite est tout d'abord réalisée à l'aide de forts agents oxydants ($KMnO_4$ et H_2SO_4 par exemple). L'oxydation ajoute des fonctions époxydes, carboxyles et hydroxyles à la surface graphitique. Puis, une exfoliation mécanique permet d'obtenir des feuillets individuels de GO, stables en dispersion aqueuse. Les méthodes pour parvenir à la synthèse du GO ont été développées par Brodie (Brodie, 1859), Staudenmaier (Staudenmaier, 1898), Hummers (Hummers et Offeman, 1958) et d'autres auteurs (Marcano *et al.*, 2010; Tölle *et al.*, 2014). Bien qu'elles permettent des rendements très élevés et qu'elles soient utilisables à l'échelle industrielle, elles ne sont généralement ni écologiques, ni économiques. Toutefois, des études plus récentes montrent des résultats prometteurs vis-à-vis de l'efficacité de production et de purification du GO (Ceriotti *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Panatarani *et al.*, 2016). Brièvement, la purification du GO consiste à éliminer les résidus non oxydés et les impuretés issues des agents oxydants et/ou de la matière première (le graphite lui-même, pouvant contenir des impuretés métalliques) au moyen de centrifugations répétées, de filtration frontale, de filtration tangentielle, ou de dialyse (Chen *et al.*, 2015). En tant que tel, le GO peut avoir de nombreuses applications (Ceriotti *et al.*, 2015), mais il n'est pas un bon

conducteur d'électricité en raison de la perturbation de la structure π-orbitale au niveau de ses fonctions oxydées (Stankovich *et al.*, 2007). Les fonctions oxygénées sont donc ensuite éliminées par réduction thermique (à environ 1000°C en général) ou chimique (avec par exemple de l'hydrazine, des hydrures[1], de l'hydroquinone ou du dioxyde de titane sous lumière UV), augmentant ainsi la conductivité du matériau (Becerril *et al.*, 2008; Chua et Pumera, 2014; Eda et Chhowalla, 2010; Jang *et al.*, 2012; X. Wang *et al.*, 2008). Le principal avantage de la production de graphène par conversion à partir du GO est son faible coût, allié à une grande adaptabilité. Les feuillets produits ont une surface relativement grande (supérieure à 20 x 40 µm), permettant de faciliter leur manipulation et leur caractérisation (Basu *et al.*, 2013). Cependant, la comparaison des propriétés électriques du graphène obtenu *via* la réduction du GO et de celui obtenu par la méthode précédente montre que dans le premier cas, la résistivité est deux à trois fois plus grande (Gomez-Navarro *et al.*, 2007). Cela peut être dû à la présence de défauts affectant localement la structure bidimensionnelle des particules, défauts qui seraient introduits pendant la phase d'oxydation (Gomez-Navarro *et al.*, 2007; Kudin *et al.*, 2008; Stankovich *et al.*, 2007). Le matériau obtenu par réduction du GO est de moins bonne qualité que le graphène pur, et est couramment nommé oxyde de graphène réduit (rGO, pour « reduced graphene oxide » en anglais) (Li *et al.*, 2008). Par contre, ce rGO est produit avec une grande proportion de mono-feuillets graphéniques, et il présente de très bons rendements.

Par ailleurs, le graphène (dit épitaxial) peut être développé sur des substrats spécifiques, ce qui permet notamment de l'incorporer facilement aux endroits d'intérêt, dans l'industrie de l'électronique. C'est d'ailleurs dans cette optique que cette méthode fut proposée pour la première fois (Berger *et al.*, 2004). Le carbure de silicium (SiC) est particulièrement utilisé pour cette technique : il est chauffé sous ultravide afin d'être thermiquement réduit. Le silicium se désorbe du SiC à environ 1000°C, laissant place à une surface enrichie en carbone. Celle-ci subit alors une réorganisation, en laissant derrière elle de petits îlots de carbone graphitisés. Ce processus se nomme graphitisation sous vide. La taille du film produit dépend de la taille du substrat utilisé. Le graphène épitaxial produit sur substrat de SiC présente des propriétés électroniques similaires à celles du graphène isolé (Hass *et al.*, 2008).

La synthèse de graphène à faible coût et à grande échelle par dépôt de vapeur chimique (CVD, pour « chemical vapor deposition » en anglais) sur de fines couches de métaux (< 300 nm) est une autre technique alternative (Kim *et al.*, 2009; Reina *et al.*, 2009). Le film de métal (par

---

[1] L'ion hydrure est l'anion d'hydrogène H^-. Par extension, le terme hydrure désigne un composé chimique constitué d'hydrogène et d'un autre élément encore moins électronégatif (ou d'électronégativité comparable).

exemple Ni, Co, Pt, Ru, etc. sur substrat de SiO_2/Si) est exposé à un flux de gaz d'hydrocarbure (tel que le méthane) à haute température (900-1000°C), causant une saturation en carbone du métal. Cette étape est suivie d'un refroidissement rapide de l'échantillon, ce qui entraine une diminution de la solubilité solide du carbone dans le métal, et ainsi, la précipitation du carbone sous forme de films de graphène (1-10 feuillets) à la surface du métal. La qualité du graphène obtenu est au moins aussi élevée que celle du graphène exfolié. En outre, cette méthode permet de créer des patrons de graphène de la géométrie voulue, en fixant la géométrie de la surface de métal au préalable (Basu *et al.*, 2013). Cette méthode peut être modulée en fonction du métal choisi. C'est le cas avec des feuilles de cuivre (d'épaisseur 25 µm environ) qui, soumises à un mélange de méthane et d'hydrogène, permettent d'obtenir un graphène de grande taille et de haute qualité (Li *et al.*, 2009). Ici, de par la faible solubilité du carbone dans le cuivre, la formation du graphène se limite d'elle-même à un unique feuillet de carbone.

Même si l'objectif de toutes ces techniques est généralement de produire un graphène avec un unique feuillet de carbone, du graphène multi-feuillet est souvent produit simultanément (Herron *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). Ce dernier est souvent vu comme un sous-produit de la production de graphène, bien qu'il puisse être utile dans différentes applications (Georgakilas *et al.*, 2015).

Enfin, de manière étroitement liée à sa synthèse, la purification du graphène est une étape importante pour obtenir des échantillons contenant essentiellement les nanoparticules désirées, et donc pour pouvoir étudier spécifiquement l'effet de ces dernières sur les organismes dans notre cas. Effectivement, la présence d'impuretés pourrait mener à une interprétation biaisée des résultats. La purification consiste en la séparation du graphène d'autres entités issues de sa synthèse (par exemple, des résidus métalliques, des résidus organiques). Elle peut être assurée par divers protocoles selon les impuretés visées. Par exemple, nous avons précédemment décrit que les résidus issus de la synthèse du GO pouvaient être éliminés par centrifugations répétées, filtration frontale, filtration tangentielle, ou dialyse. De plus, le graphène (ou l'oxyde de graphène réduit) produit à partir du GO n'est pas toujours pur après l'action d'agents réducteurs : une partie de GO non complètement réduit peut persister dans le produit final, incluant aussi des impuretés azotées. Afin d'éliminer cette fraction non désirée, Sridhar et Oh (2010) ont mis au point une méthode efficace de coagulation consistant à séparer le graphène du GO restant. Pour cela, les auteurs ont dispersé le graphène partiellement réduit dans de l'eau déionisée par ultrasonication avant d'ajouter une solution d'alcool polyvinylique (PVA) à la dispersion. Le mélange a été chauffé à 45-50°C afin de recueillir le graphène (pur) flottant à la

surface, tandis que tout le GO a sédimenté rapidement, formant une masse gélifiée avec le PVA (qui forme des liaisons hydrogènes avec les fonctions oxygénées du GO). Un autre exemple de purification est celui du graphène préparé par exfoliation à l'aide de surfactants, lesquels représentent un taux important de résidus ancrés à la surface graphénique même après lavage (Choi *et al.,* 2010; Lotya *et al.*, 2010). Des techniques permettant d'éliminer spécifiquement les surfactants peuvent alors être employées, comme par exemple la filtration combinée à une hydrolyse acide pour éliminer la gomme arabique (Chabot *et al.*, 2013).

2.3.2. Synthèse et purification des nanotubes de carbone

La relation entre la structure moléculaire (ou chiralité des NTC) et leurs propriétés est particulièrement intéressante dans la mesure où les NTC sont intrinsèquement adaptables à la fonction visée (de conducteurs à semi-conducteurs). Cependant, leur utilisation commerciale en électronique n'est pas actuellement réalisable, puisque contrôler la synthèse d'un type de nanocarbone voulu n'est pas encore possible. Il n'y a en effet aucune méthode de synthèse ou de technique de purification adéquate pour produire des nanotubes uniformes à l'échelle industrielle, malgré des années de recherche multidisciplinaire (Sisto *et al.,* 2016).

Les nanotubes de carbone sont généralement produits selon trois techniques majeures : la décharge d'arc électrique, l'ablation laser, et le dépôt chimique catalysé en phase vapeur (Karthikeyan *et al.,* 2009).

Au cours de la synthèse par décharge d'arc électrique, une vapeur est créée par la décharge entre deux électrodes de graphite sous atmosphère inerte (argon ou hélium), avec ou sans catalyseur. Pour cela, un courant de 50 à 100 A est appliqué entre les électrodes *via* une différence de potentiel d'environ 20 V. Ceci crée un arc électrique de haute température (> 3000°C), laquelle est requise pour vaporiser les atomes de carbone à l'état de plasma sur l'anode (Ebbesen et Ajayan, 1992; Seraphin *et al.*, 1993). Les NTC s'assemblent d'eux-mêmes sur la cathode par condensation à partir de la vapeur de carbone résultante (Wilson *et al.*, 2002). Cette méthode contrôlée est la première à avoir été utilisée pour la synthèse des NTC par Iijima & Ichihashi (1993). En utilisant une anode de graphite contenant un catalyseur métallique (Fe ou Co par exemple), il est également possible de produire des SWCNT (Bethune *et al.*, 1993; Iijima et Ichihashi, 1993). Si cette technique permet d'obtenir des NTC de qualité structurale élevée (Ebbesen et Ajayan, 1992), son emploi à grande échelle reste cependant limité compte tenu des faibles quantités produites.

Une autre méthode de synthèse des NTC est l'ablation laser. Comme précédemment, elle consiste à vaporiser les atomes de carbone du graphite, mais cette fois à l'aide d'un laser de haute énergie, toujours sous atmosphère inerte. Les atomes de carbone se réarrangent alors majoritairement au niveau de la zone d'impact du laser, formant des SWCNT et MWCNT de manière très spécifique et de bonne qualité structurale, c'est-à-dire avec un minimum de défauts et de contaminants, tels que du carbone amorphe ou des métaux catalytiques (Chiang *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2003). Il est notamment possible de contrôler le diamètre des NTC en jouant sur la température et les métaux catalytiques (Kataura *et al.*, 2000). Le caractère contrôlable de durée de la vaporisation laser est un autre avantage de la méthode. Cependant, l'ablation laser n'est pas économiquement avantageuse puisqu'elle implique des barres de graphite de grande pureté, et des lasers de grande puissance pour des rendements de NTC finalement faibles (Karthikeyan *et al.*, 2009).

Enfin, les NTC peuvent être synthétisés par dépôt de vapeurs chimiques catalysé (CCVD en anglais, pour « Catalyst Chemical Vapor Deposition »), comme c'est le cas de ceux utilisés dans nos travaux. Le principe de cette méthode est de décomposer un précurseur contenant du carbone (tel que l'acétylène, l'éthylène, l'éthanol, le monoxyde de carbone, etc.) pour ensuite condenser les atomes de carbone autour d'un catalyseur métallique (Co, Ni, Fe, ou une combinaison de Co/Fe ou Co/Mo), à des températures supérieures à 600°C (Aqel *et al.*, 2012). La synthèse peut se faire de manière assez spécifique, contrôlant la proportion de SWCNT ou de MWCNT produits. Notamment, la morphologie et le degré de cristallinité des NTC sont influencés par différents paramètres contrôlables, incluant la nature chimique du catalyseur métallique utilisé, la température de réaction, la composition du gaz précurseur, etc. (Flahaut *et al.*, 2003). Cette méthode est la plus prometteuse en termes de rapport prix/quantité, et la seule pouvant permettre une production des NTC à l'échelle industrielle (Awasthi *et al.*, 2005; See et Harris, 2007).

La purification des NTC peut être réalisée à travers trois techniques majeures, dont la purification en phase gazeuse, la purification en phase liquide, et la purification par intercalation (Nanowerk, 2017). La première méthode permet d'éliminer la plupart des impuretés carbonées au moyen de l'oxydation de l'échantillon en présence d'acide nitrique et/ou chlorhydrique sous haute température. Ce traitement s'avère destructeur pour les NTC présentant des défauts de structure, tandis qu'il n'a que peu d'effet sur les NTC présentant peu ou pas de défauts. Aussi, une grande partie des NTC contenus dans l'échantillon de départ sont éliminés par le traitement.

Néanmoins, cette technique permet de traiter facilement de grandes quantités d'échantillon et d'obtenir au final des NTC d'excellente qualité structurale (Ebbesen et Ajayan, 1992).

D'autre part, la purification en phase liquide consiste quant à elle à une succession d'étapes, la première permettant l'élimination des grosses particules graphitiques à l'aide d'une séparation mécanique par filtration. S'ensuit une dissolution chimique des résidus catalytiques et de substrats dans des acides concentrés, et des fullerènes dans des solvants organiques. Des centrifugations et des rinçages successifs par microfiltration permettent de retenir sélectivement les NTC sur le filtre tout en éliminant les résidus. De plus, cette méthode peut être couplée à la sonication par ultrason pour faciliter la désorption des impuretés (Ebbensen *et al.*, 1994).

Enfin, il est aussi possible de purifier les NTC (principalement ceux produits par arc électrique) par intercalation de chlorures de métaux. Cette méthode est basée sur le fait que les résidus graphitiques sont des structures relativement éparses qui peuvent être plus facilement intercalées par divers métaux que les NTC, lesquels sont fortement agglomérés entre eux. Aussi, l'intercalation du chlorure de cuivre, servant de catalyseur d'oxydation, permet d'oxyder préférentiellement les nanoparticules résiduelles (isolées) tout en limitant l'attaque des faisceaux de NTC. Néanmoins, le taux de destruction des NTC n'est pas négligeable, et de plus, l'échantillon obtenu peut être cette fois contaminé par des résidus des intercalants.

2.3.3. Synthèse et purification des nanodiamants

La taille, la forme et la qualité des nanodiamants sont déterminées par les méthodes utilisées pour les produire. La technique la plus répandue pour la production de ND à grande échelle implique la détonation de mélanges explosifs de composés à base de carbone, tels que le trinitrotoluène et l'hexogène (Georgakilas *et al.*, 2015). Des nanodiamants de diamètre compris entre 4 et 5 mm avec une gamme étroite de distribution de taille représentent alors plus de 75 % du produit obtenu. Néanmoins, un inconvénient majeur de cette technique est que les ND tendent à former des agglomérats qui ne sont pas dispersables dans l'eau, ni dans des solvants organiques, et qui sont de ce fait difficiles à purifier ou à manipuler. Ces agglomérats sont souvent enrobés dans une couche de matériau graphénique, ce qui complique d'autant plus la dispersion des ND (Krueger, 2008). De tels agglomérats peuvent être détruits mécaniquement par broyage (avec des microbilles de céramiques) ou par ultrasonication. Ces procédés rendent alors les ND très hydrophiles, si bien qu'ils peuvent alors être facilement dispersés dans des solvants polaires (Ozawa *et al.*, 2007). Des méthodes alternatives faisant intervenir un broyage assisté par des sels ou des sucres a aussi été développé pour empêcher la ré-agglomération des

ND (Pentecost *et al.*, 2010). Les produits issus de la détonation peuvent être ensuite purifiés par oxydation par ozone, ou bien par l'utilisation d'acides oxydants concentrés sous haute température, permettant d'éliminer sélectivement le carbone amorphe et graphitique ou les impuretés métalliques (Osswald *et al.*, 2006; Shenderova *et al.*, 2011).

Une autre méthode de synthèse des ND emploie l'irradiation par laser pulsé d'une suspension de noir de carbone commercial, sans conditions de température et de pression particulières (Hu *et al.*, 2009). Cette synthèse est suivie d'une phase de purification consistant à faire bouillir le produit dans de l'acide perchlorique de sorte à éliminer des nanoparticules de carbone non modifiées (le CB). Les ND ainsi préparés ont des diamètres de 3 à 6 nm avec une étroite gamme de distribution de taille et sont facilement dispersables.

Une technique de broyage à bille à haute énergie a également été développée pour produire des ND avec de bons rendements (Boudou *et al.*, 2009). Le matériau de départ est un microcristal de diamant lui-même synthétisé à l'aide d'un catalyseur métallique par irradiation sous haute pression haute température (HPHT), puis recuit sous vide. Ce matériau est ainsi soumis à une micronisation par broyage suivie d'un broyage plus fin (nano-broyage) pour générer des ND sphériques ultrafins.

Enfin, d'autres auteurs ont plus récemment mis au point une méthode alternative simple et peu onéreuse pour produire des ND de haute pureté. Cette méthode est basée sur la dissociation de l'éthanol à l'aide d'un microplasma, sous atmosphère inerte (Kumar *et al.*, 2013). Les sous-produits carbonés des nanodiamants s'associent avec l'hydrogène présent, laissant les ND purs. D'autres méthodes incluant l'irradiation pulsée du graphite, l'irradiation de nanoparticules carbonées dites « onion-like » par des électrons, ou encore la chloration de carbure ont aussi été utilisées pour produire des nanodiamants (Georgakilas *et al.*, 2015).

2.3.4. Synthèse et purification du noir de carbone

Alors qu'il est produit depuis l'Antiquité, le noir de carbone est aujourd'hui synthétisé en conditions contrôlées par combustion incomplète ou décomposition thermique d'hydrocarbures liquide ou gazeux. Deux processus de synthèse (dits « furnace black » et « thermal black ») sont à l'origine de presque tous les noirs de carbone produits, le procédé de « furnace black » étant le plus répandu, et étant celui utilisé pour le CB dont nous nous sommes servis pendant cette thèse.

Ce procédé consiste à utiliser des huiles aromatiques comme matière première et à les pyrolyser à l'aide d'un réacteur sous des conditions bien définies de température et de pression (International Carbon Black Association, 2016b). Pour cela, l'échantillon de matière première est introduit dans un flux de gaz chaud (de l'ordre de 1300°C) où il est vaporisé, puis pyrolysé pour former des particules de carbone. Le noir de carbone ainsi formé est alors refroidi très rapidement à 1000°C par pulvérisation d'eau (ce qui a pour effet d'arrêter la réaction), avant d'être collecté par des filtres, cela de manière continue. Le temps entre la formation du noir de carbone et la fin de la réaction est d'environ deux secondes. Un réglage fin de la température et du temps de réaction permet de contrôler la taille des particules élémentaires et leur texture (Poisson, 2015). A ce stade, le noir de carbone peut subir de nouveaux traitements afin d'éliminer ses impuretés. Puis, après avoir été recueilli sur les filtres, le CB est généralement transformé en agglomérats, séché, examiné et préparé pour le transport. D'autre part, les gaz résiduels issus du réacteur (par exemple du monoxyde de carbone et de l'hydrogène) peuvent en partie être récupérés pour la production de chaleur, de vapeur, ou d'énergie électrique.

Par ailleurs, le procédé dit « thermal black » a quant à lui recours à des gaz naturels (principalement représentés par le méthane) comme source de matière première (International Carbon Black Association, 2016b). La technique consiste à utiliser une paire de fours alternant approximativement toutes les cinq minutes entre une phase de préchauffage et une phase de production de noir de carbone. Le gaz naturel est injecté dans le four dont les parois ont tapissées de revêtement réfractaire et, en absence d'air, la chaleur provenant de ce matériau réfractaire permet de décomposer le gaz naturel en noir de carbone et en hydrogène. Le flux d'aérosols obtenu est alors refroidi par pulvérisation d'eau, puis filtré et recueilli. Le CB peut alors être traité par différents processus afin d'éliminer ses impuretés, mais aussi afin de le conditionner au transport en le transformant en agglomérats, et en contrôlant sa qualité. Enfin, l'hydrogène de dégagement est brûlé afin de garantir le préchauffage du deuxième four, tandis que la chaleur résiduelle peut servir à alimenter l'énergie électrique.

En général, le noir de carbone est majoritairement constitué de carbone pur (> 97 %), bien qu'il puisse aussi contenir des impuretés telles que des composés organiques (< 1 % de sa composition en général), incluant des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). De tels contaminants peuvent être éliminés par des procédures variées, notamment *via* l'utilisation de solvants organiques agressifs et de hautes températures. L'eau et les fluides biologiques sont considérés comme inefficaces pour éliminer les HAP de la surface du CB. Aussi, ces HAP ne

sont pas considérés comme biodisponibles lorsqu'ils sont adsorbés au CB (International Carbon Black Association, 2016b).

2.4. Fonctionnalisation covalente et non-covalente

Outre la dispersion mécanique des NPC (par sonication, ultraturax, vortex ou agitation manuelle) suite à leur mise en suspension, il existe des moyens chimiques pour séparer les NPC les uns des autres. Du fait de leur caractère hydrophobe, les seuls NPC (c'est-à-dire les NPC sous leur forme brute, « nue ») ont tendance à se ré-agglomérer rapidement entre eux *via* des forces de Van des Waals après avoir été dispersés mécaniquement. Pour limiter cela, il est possible de modifier la surface des NPC en y ajoutant des groupements fonctionnels. Deux types majeurs de fonctionnalisations chimiques -covalent ou non-covalent- peuvent être utilisés pour stabiliser les NPC dans différents solvants. Ces types peuvent eux-mêmes se décliner en diverses catégories comme illustré par la Figure 8. Qu'elle soit covalente ou pas, cette fonctionnalisation peut avoir lieu aussi bien sur des NPC bruts que sur des NPC déjà eux-mêmes fonctionnalisés de manière covalente (Georgakilas *et al.*, 2012). Aucune des nanoparticules de carbone utilisées lors de ces travaux de thèse n'a été « doublement » fonctionnalisée. Ici ne seront donc développés que les cas de fonctionnalisation à partir de NPC bruts.

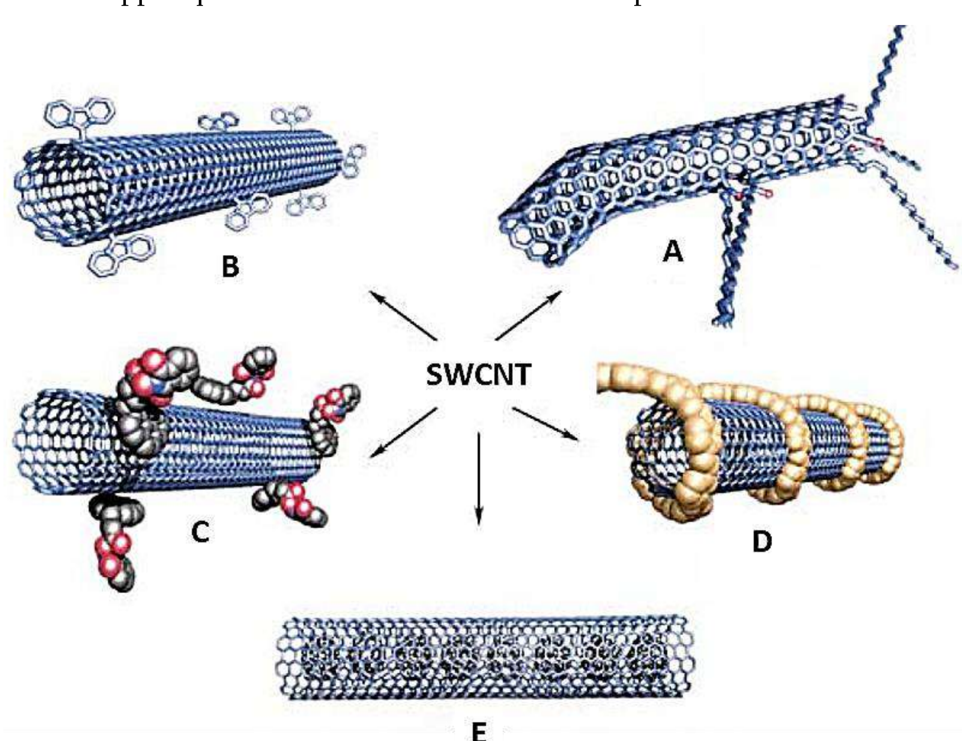


Figure 8. Formes possibles de fonctionnalisation, à travers l'exemple des SWCNT. A : fonctionnalisation *via* la présence de défauts de structure ; B : fonctionnalisation covalente via la présence de groupements greffés à la surface des SWCNT ; C : fonctionnalisation exohédrale non-covalente avec des surfactants ; D : fonctionnalisation exohédrale non-covalente avec des polymères ; E : fonctionnalisation endohédrale avec par exemple des fullerènes C_{60}. Pour les représentations schématiques de B à E, les tubes sont représentés de manière théorique, bien qu'en réalité ils puissent souvent présenter des défauts de structure comme illustré en A (d'après Hirsch, 2002).

2.4.1. Fonctionnalisation non-covalente

Le premier type de fonctionnalisation, non-covalent, consiste en l'adsorption d'un agent (molécules organiques en général) à la surface des NPC. Le dépôt de l'agent en question est plus ou moins homogène (Liu *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009), et il n'altère pas la structure des NPC. Par ailleurs, cette fonctionnalisation est potentiellement réversible selon les conditions physico-chimiques auxquelles les NPC sont soumises (Di Crescenzo *et al.*, 2014). La stabilité de ce type de dispersion est dépendante tant du choix de l'agent dispersant que des paramètres abiotiques du milieu (pH, température, force ionique, éventuelle compétition avec des molécules organiques en présence, etc.) (Gigault *et al.*, 2012; Grillo *et al.*, 2015; Mu *et al.*, 2014; Paredes *et al.*, 2008).

La fonctionnalisation non-covalente est rendue possible par les systèmes π-π des atomes de carbone sp^2 des NPC, permettant des interactions (électrostatiques, hydrophobes, de type π-π) avec des molécules diverses (Ersan *et al.*, 2017; Hunter et Sanders, 1990; Zhao *et al.*, 2014; Zhou et Gao, 2014). Contrairement aux nanostructures sp^2, les nanodiamants contiennent majoritairement des carbones sp^3, limitant leurs liaisons avec les protéines à des interactions hydrophobes et à de l'adsorption physique (Kong *et al.*, 2005). Les interactions entre les groupes aromatiques des nanoparticules de carbone sp^2 et les résidus aromatiques ou amines des protéines jouent notamment un rôle crucial dans ces liaisons, d'où l'importance de considérer tant la nature des protéines que celle des NPC pour déterminer leur interaction (Bradley *et al.*, 2004; Nepal et Geckeler, 2006). Lorsque des nanoparticules brutes (« nues ») rencontrent des macromolécules biologiques, celles-ci peuvent former une nanostructure hybride (essentiellement protéique, voire lipidique) appelée corona (ou couronne), qui comme son nom l'indique entoure la nanoparticule (Monopoli *et al.*, 2012; Pelaz *et al.*, 2013). De plus, il est possible qu'une corona secondaire de protéines vienne se former autour de la première, du fait des interactions protéine-protéine (Ling *et al.*, 2011). Cet « enrobage » confère alors des propriétés différentes aux NPC, par exemple un caractère hydrophile leur permettant de se repousser les unes les autres par forces électrostatiques. Ainsi, cette fonctionnalisation non-covalente peut être utilisée pour la stabilisation et le dégroupement des NPC, mais aussi pour la détection de protéines ou encore pour des applications environnementales, catalytiques, énergétiques, ou bien pour l'administration ciblée de médicaments (Georgakilas *et al.*, 2016; Matsuura *et al.*, 2006; Nepal et Geckeler, 2006). Les protéines liées aux NPC peuvent cependant voir leur structure et leur activité modifiées de par des changements de conformation (Shen *et al.*, 2008; Zhou et Gao, 2014).

Ce sont ces mêmes types d'interactions (NPC-protéines) qui conditionnent les affinités entre les NPC et le vivant. Des nanoparticules de propriétés physico-chimiques différentes montrent des interactions différentes avec les systèmes biologiques. Les effets des NPC peuvent être grandement conditionnés par la présence de corona, composée de protéines de différente nature, permettant potentiellement leur liaison avec des protéines de la membrane cellulaire, leur entrée dans les cellules, et pouvant être à l'origine de divers degrés de compatibilité avec les systèmes physiologiques (Mu *et al.*, 2014). Enfin, les nanoparticules peuvent aussi adsorber des polluants environnementaux, séquestrer des molécules nutritives, ou encore perturber l'équilibre redox, menant à des effets multiples chez les organismes.

2.4.2. Fonctionnalisation covalente

La fonctionnalisation covalente implique des modifications permanentes de la structure des NPC. Elle consiste à rompre certaines liaisons covalentes entre leurs atomes de carbone pour ensuite former de nouvelles liaisons covalentes avec différents groupes fonctionnels.

Les espèces organiques pouvant réagir avec les carbones sp^2 des nanostructures graphéniques comptent parmi elles les radicaux libres et les diénophiles[1], qui peuvent être utilisés pour modifier les propriétés initiales des NPC. Par exemple, le degré de conductivité du graphène peut être modulé par la production contrôlée de radicaux libres hautement réactifs, capables de détruire la structure aromatique en transformant les atomes de carbone sp^2 en sp^3 (Sinitskii *et al.*, 2010). Ainsi, le rapport entre les atomes de carbone d'hybridation sp^2 et sp^3 renseigne sur le degré de fonctionnalisation covalente des NPC graphéniques (Georgakilas *et al.*, 2012). L'addition covalente de diénophiles aux carbones sp^2 permet la création d'une grande variété de dérivés organiques de dispersibilité variable (Liu *et al.*, 2010; Strom *et al.*, 2010), offrant des applications dans plusieurs domaines, incluant les matériaux composites, les appareils nanoélectroniques, les biotechnologies, l'administration de médicaments, et les cellules solaires (Cioffi *et al.*, 2006; Georgakilas *et al.*, 2008; Kostarelos *et al.*, 2007). Par exemple, la fonctionnalisation covalente des feuillets de graphène avec des groupes carboxylates facilite la fixation des nanoparticules d'or, qui sont quant à elles utilisées comme marqueurs pour suivre la distribution des nanoparticules de carbone en question (Vadukumpully *et al.*, 2011).

D'autre part, la fonctionnalisation covalente des NPC fait souvent appel à leur oxydation, *via* des traitements par acides forts (Hummers et Offeman, 1958), afin de former des groupes

[1] Diénophile : alcène qui s'additionne à un diène conjugué pour former un dérivé de cyclohexène.

oxygénés variés à leur surface. La nature et la densité de ces derniers sont difficiles à contrôler. Pour ce qui est de l'oxyde de graphène, qui comprend à la fois des régions aromatiques (atomes de carbone sp^2) et des régions oxygénées aliphatiques (atomes de carbone sp^3), les fonctions époxydes et carboxyles seraient situées sur le plan des feuillets, alors que les carboxyles seraient plutôt retrouvés sur les bords de ces derniers. En outre, les groupes oxygénés donneraient au GO de remarquables propriétés hydrophiles ainsi qu'une réactivité chimique analogue (Georgakilas *et al.*, 2012). Ces fonctions oxygénées peuvent aussi servir de base pour former des liaisons covalentes avec d'autres groupes fonctionnels, par exemple par estérification (COO-R) ou amidisation (CONH-R).

3. Le devenir des nanoparticules de carbone dans l'environnement

3.1. Voies de contamination des milieux environnementaux

Les nanoparticules de carbone sont susceptibles d'être libérées dans l'environnement tout au long de leur cycle de vie, incluant leur production, leur transformation (incorporation dans des produits manufacturés, fonctionnalisation, etc.), leur utilisation, et leur recyclage ou destruction (Gottschalk *et al.*, 2010; Piccinno *et al.*, 2012). Les travailleurs (industriels, chercheurs) peuvent par exemple être exposés à des émissions de NPC lors de divers processus (Kuhlbusch *et al.*, 2011). Ainsi, il a été montré que la simple manipulation de SWCNT pouvait conduire à la dispersion de faibles quantités dans l'air ainsi qu'à un dépôt sur les gants des manipulateurs (Maynard, 2006). Bien qu'aucune information concernant les émissions de graphène sur les lieux de travail ne soit disponible à notre connaissance, compte tenu de sa taille, il parait peu probable qu'il soit volatile. Néanmoins, le graphène pourrait s'adsorber sur des poussières aériennes et être alors libéré dans l'atmosphère (Arvidsson *et al.*, 2013). D'autre part, la phase d'incinération des NPC lors de la destruction des matériaux les contenant représente une étape déterminante pour leur potentiel rejet. Les NPC peuvent notamment être retrouvées dans les cendres en cas d'incinération insuffisante, bien que ces dernières soient normalement transférées dans des installations de stockage des déchets dangereux (ISDD) (Koelmans *et al.*, 2009). Par ailleurs, le rejet des eaux usées, l'épandage des boues de stations d'épuration, de même que le déversement accidentel de NPC lors de leur manipulation peuvent les amener à être retrouvées dans la nature. De manière générale, et sur la base de leurs production et applications, Keller *et al.* (2013) estiment que 63 à 91 % des nanoparticules manufacturées produites en 2010 ont terminé en décharge, 8 à 28 % dans les sols, 0,4 à 7% dans l'eau, et 0,1 à 1,5 % dans l'atmosphère. Au sein de ces particules, les nanotubes de carbone termineraient à 83-98 % en décharge, 2,2-14,8 % dans le sol, 0,1-1,4 % dans l'air et à 0,01-0,6 % dans l'eau.

Ainsi, la répartition des NPC dépendrait de leurs applications (Arvidsson *et al.*, 2013; Keller *et al.*, 2013) Par conséquent, l'usure (par abrasion, dégradation, etc.) des matériaux à base de nanocarbones devrait représenter une grande partie de la libération non contrôlée des NPC dans l'environnement.

Le devenir des NPC libérées dans l'environnement va ensuite dépendre de leurs caractéristiques physico-chimiques, ainsi que de différents vecteurs. Comme de nombreux autres contaminants, les vents et les dépôts atmosphériques, les précipitations, le ruissellement ou encore la lixiviation peuvent jouer sur leur transport et leur répartition. Le comportement des nanoparticules au sein des écosystèmes, c'est-à-dire dans des milieux complexes, repose sur leur chimie de surface (incluant leurs groupes fonctionnels covalents ou non), leur surface spécifique, leur charge de surface (ou potentiel Zeta[1]), leur masse, ainsi que leur distribution de taille (Kennedy *et al.*, 2008; Klaine *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2008; Von Der Kammer *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014). Au final, les voies d'entrée potentielles des NPC dans l'environnement peuvent être liées à des sources de contaminations ponctuelles (usine de production, zone d'enfouissement, effluents d'eaux usées) ou diffuses (dépôts atmosphériques, ruissellement des eaux de pluies, usures de produits en contenant pendant leur utilisation) (Wiesner *et al.*, 2006). Ces NPC peuvent ainsi atteindre le compartiment aquatique, bien connu pour être un réceptacle important de pollution (Baun *et al.*, 2008).

3.2. Les écosystèmes aquatiques, réceptacles de pollution

L'eau douce représente seulement une infime partie (2,5 %) du volume global d'eau de la planète. Cette partie se divise elle-même entre l'eau douce à l'état solide dans les calottes glaciaires (environ 73,4 %) et l'eau douce à l'état liquide présente dans le sol (aquifère, rivières souterraines, etc. environ 26 %), si bien que les eaux liquides de surface ne représentent en fait que 0,6 % de l'eau douce du globe (Lévêque, 1996). Les écosystèmes d'eau douce présentent une diversité importante, englobant les milieux abiotiques dulçaquicoles et les espèces vivantes s'y développant. Qu'il s'agisse des milieux lentiques (lacs, mares, étangs, zones humides) ou lotiques (torrents, ruisseaux, rivières, fleuves), les milieux dulçaquicoles sont caractérisés par une faible profondeur par comparaison aux milieux marins, permettant des échanges importants aux interfaces air-eau et eau-sédiment. En raison de l'anthropisation, les écosystèmes actuels, même ceux dits naturels, présentent tous des traces de l'activité humaine, incluant des rejets

[1] Potentiel Zeta : charge électrique qu'acquiert une particule grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution.

polluants (agricoles, industriels, ménagers). Le ruissellement au sein des bassins versants, l'infiltration, le transport et les dépôts atmosphériques sont des phénomènes qui mobilisent les polluants, et qui peuvent les transférer jusque dans des puits de contamination où ils sont susceptibles de séjourner jusqu'à ce qu'ils soient dégradés (volatilisation, photo-dégradation, précipitation, solubilisation), ou transférés ailleurs de nouveau. De nombreux facteurs peuvent influencer le comportement des contaminants dans le milieu aquatique. Par exemple, la matière organique naturelle (constituée d'un mélange complexe d'acides humiques et fulviques, entre autres) des milieux dulçaquicoles peut permettre la dispersion et le maintien en suspension des NPC (Lagier *et al.*, 2017; Verneuil, 2015; Verneuil *et al.*, 2015), alors que certaines molécules peuvent au contraire accélérer l'agglomération et la sédimentation des nanoparticules (Quik *et al.*, 2013). Globalement, les écosystèmes d'eau douce sont particulièrement concernés par l'accumulation de polluants, y compris par des contaminants émergents dont les nanoparticules de carbone font partie.

3.2.1. Propriétés d'adsorption des NPC dans les milieux aquatiques

Bien que la littérature soit limitée quant au devenir des nanoparticules dans des matrices environnementales complexes, il apparait que celles-ci ne se comportent pas comme les autres contaminants. Les NPC pourraient tout d'abord interagir avec les composants du système tels que les ions inorganiques et la matière organique naturelle (NOM, en anglais « natural organic matter »), et cela *via* différentes interactions moléculaires : principalement des interactions π-π, mais aussi des effets hydrophobes, des interactions électrostatiques (force de Coulomb), des liaisons hydrogènes ou des interactions acide-base (Zhao *et al.*, 2014). Ces processus d'adsorption pourraient non seulement modifier la chimie de surface des NPC, mais aussi altérer la mobilité et le devenir de la matière organique (acides humiques, acides aminés, protéines, etc.) et des xénobiotiques (métaux lourds, composés organiques hydrophobes, etc.) dans le milieu, et par conséquent influencer l'écotoxicité des NPC.

Dans les écosystèmes aquatiques, plusieurs types d'adsorbats coexistent et sont susceptibles d'être co-adsorbés sur les NPC. Par exemple, Xu *et al.* (2012) ont montré que des ions inorganiques pouvaient masquer la charge de surface des GFM et ainsi favoriser l'adsorption de molécules organiques négativement chargées (comme le bisphénol A à pH 6) et la suppression des molécules organiques de charge positive (comme la tétracycline à pH 3,6, d'après Gao *et al.* (2012)). De plus, l'augmentation de la force ionique de l'eau pourrait aussi causer une augmentation du relargage des molécules organiques adsorbées à la surface des

GFM. Par contre, il semblerait que la force ionique ait peu d'influence sur la capacité d'adsorption des ions métalliques par les NPC (J. Li *et al.*, 2012). Notons que ces ions métalliques sont préférentiellement adsorbés sur le GO plutôt que sur le rGO du fait de la présence de nombreux groupes fonctionnels (Ren *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2011). En revanche, le pH de l'eau serait quant à lui un facteur déterminant pour l'adsorption de métaux sur le GO (Z. Li *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2011). D'autre part, les effets de la NOM sur les processus d'adsorption sont plus complexes, si bien qu'en cas de co-adsorption avec des molécules organiques et des ions métalliques, la NOM peut se lier à ces composés ou les solubiliser. Elle peut aussi entrer en compétition avec eux, ou bien permettre leur adsorption indirecte à la surface des NPC (Zhao *et al.*, 2014). Par exemple, Apul *et al.* (2013) ont montré que la NOM avait pour effet global de supprimer l'adsorption des molécules organiques (le phénanthrène par exemple) à la surface des NPC, cet effet étant d'autant plus marqué pour les NTC que pour les GFM (à la fois graphène brut et GO). Les différences d'adsorption entre les GFM et les NTC seraient non seulement dues aux caractéristiques des nanoparticules (surface spécifique, distribution de la taille des pores, groupes fonctionnels, etc.), mais aussi aux caractéristiques des composés organiques (hydrophobicité, taille moléculaire, groupes fonctionnels, propriétés aromatiques ou aliphatiques, etc.) (Ersan *et al.*, 2017). Pour ce qui est des ions métalliques, d'autres auteurs décrivent un effet des substances humiques en faveur d'une diminution d'adsorption du Co(II) (à $pH < 8$) et du Cd(II) (à pH 2-10) à la surface du GO, ce qui serait lié à une plus forte activité de complexation des substances humiques avec la nanoparticule (Zhao *et al.*, 2011).

La complexité de ces dynamiques d'adsorption/désorption laisse entrevoir de potentiels effets écotoxicologiques, bien que la prédiction exacte de ces derniers ne soit pas encore possible. Un autre point que nous n'avons pas abordé est la séquestration des éléments nutritifs (sels, protéines, etc.) par les NPC, susceptible d'entrainer des privations pour les organismes (Cheng *et al.*, 2017). Par ailleurs, différents polluants retrouvés dans les milieux aquatiques pourraient être séquestrés par les NPC et donc ne plus être biodisponibles pour certains organismes. Ou bien au contraire, s'ils venaient à être ingérés, ils pourraient s'avérer plus toxiques par effet synergétique. Le risque des NPC complexés à divers polluants pourrait aussi être exacerbé en cas de transport et de concentration (dans les zones estuariennes par exemple), ou d'accumulation au sein des chaines trophiques.

3.2.2. Comportements d'agrégation et de dispersion de NPC dans les milieux aquatiques

Concernant le transport des NPC dans les environnements aquatiques, tout repose sur la capacité des particules à s'agréger ou à se disperser en présence des constituants qui les entourent. La chimie de l'eau peut grandement influencer la stabilité des particules et induire divers processus d'agrégation/dispersion, comme illustré par la Figure 9 à travers les exemples du GO et du rGO.

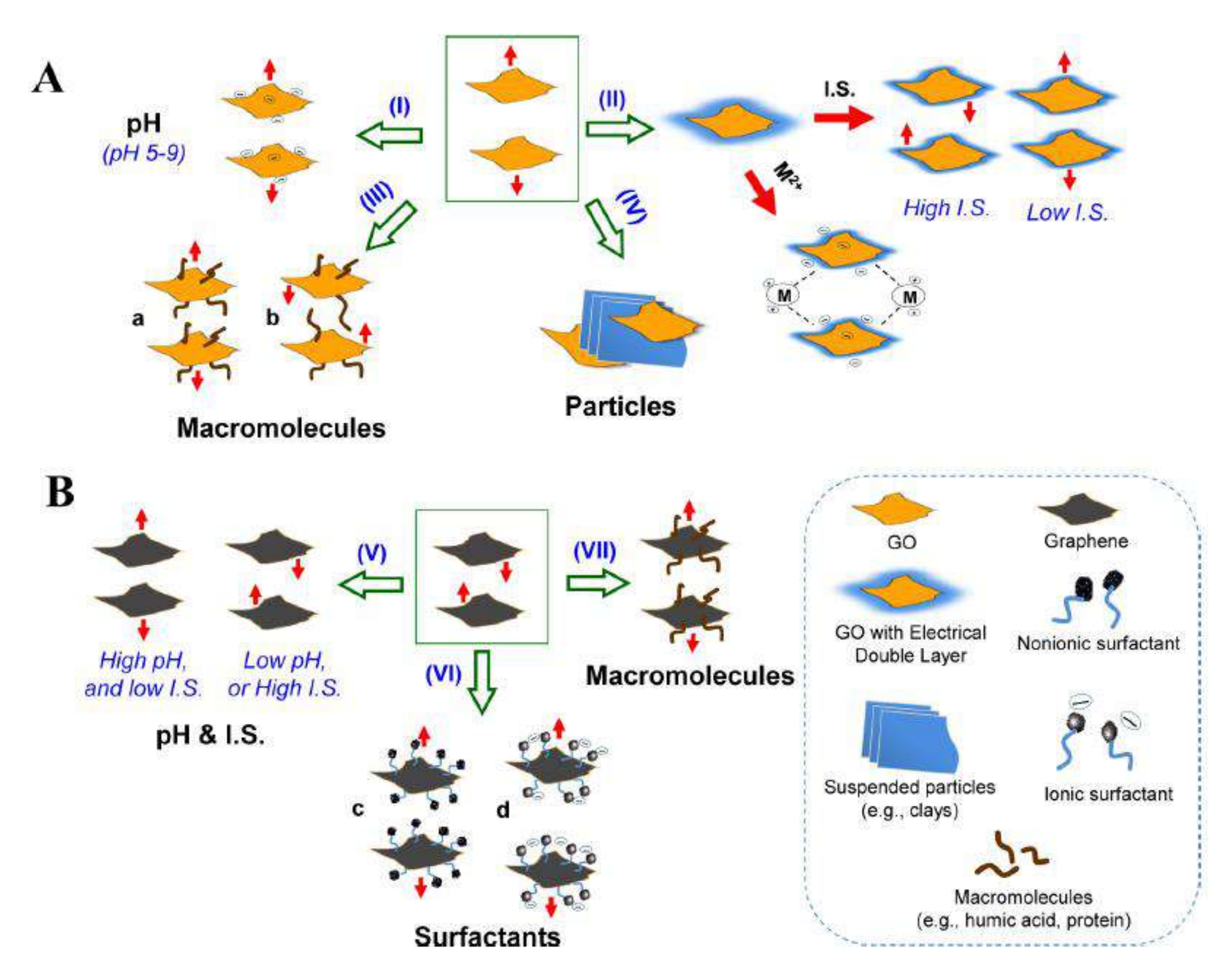


Figure 9. Comportement de dispersion et d'agrégation du GO (A) et du rGO (B) dans des environnements aquatiques. Pour le GO, la suspension peut être stable sur toute la gamme de pH retrouvée dans les milieux aquatiques (pH 5-9) (I). La compression de la couche électrique (représentée par les fonctions du GO) par des électrolytes, capables de déterminer la charge de surface, est responsable de l'homo-agrégation irréversible du GO aux fortes forces ioniques (I.S., en anglais « ionic strength ») ; de plus, l'agrégation des feuillets se produirait en présence de cations divalents ou polyvalents qui viendraient se complexer aux groupes fonctionnels du GO (II). Des macromolécules et des particules colloïdales (des argiles par exemple) peuvent aussi influence la stabilité de la suspension de GO (III et IV). Pour le rGO, les feuillets pourraient seulement être dispersés à pH élevé en présence de faibles forces ioniques (V). Des surfactants (ioniques et non-ioniques) et des macromolécules pourraient cependant disperser le rGO via différents mécanismes (VI et VII) (d'après Zhao *et al.* (2014).

Ainsi, les feuillets de GO sont généralement stables en solution du fait de leurs fonctions oxygénées qui leur confèrent un potentiel zêta compris entre -40 et -50 mV (Li *et al.*, 2008; Luo

et al., 2010; Yoon *et al.*, 2013). De plus, dans une gamme de pH environnementalement pertinente (pH 4-10), les variations d'acidité du milieu n'auraient qu'une influence minime sur la dispersion du GO (Chowdhury *et al.*, 2013). Ajoutons que la présence d'électrolytes (NaCl, KCl, $CaCl_2$, etc.) pourrait venir modifier la charge de surface du GO et conduire à une homo-agrégation irréversible, en particulier en cas de forte force ionique (Hong *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'interaction du GO avec des macromolécules comme des protéines ou des acides humiques pourrait à la fois favoriser sa dispersion, principalement par répulsion stérique (Chowdhury *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2012), ou au contraire provoquer sa floculation et sa sédimentation (Z. Yang *et al.*, 2013). L'environnement aquatique est aussi composé de nombreuses particules naturelles avec lesquelles le GO serait susceptible de former des hétéro-agrégats, comme les argiles, l'hématite ou encore la kaolinite (Z. Yang *et al.*, 2013). De leur côté, les NPC plus hydrophobes comme le rGO, mais aussi le graphène et les nanotubes de carbone bruts sont par nature moins stables dans l'eau que ne l'est le GO. Néanmoins, sous l'effet de certains constituants environnementaux comme ceux que nous venons de décrire, l'agrégation, l'agglomération et la sédimentation de ces particules pourraient être limitées par réduction des forces d'attraction inter-particulaires (van der Waals) (Liang *et al.*, 2013). D'autres molécules sont aussi capables de disperser les NPC, tels que des dérivés du pyrène (Parviz *et al.*, 2012), des acides aminés (Gao *et al.*, 2010), des polyphénols (Song *et al.*, 2012), ou des acides tanniques (Lin et Xing, 2008).

Au final, l'action des facteurs environnementaux en faveur de la dispersion des NPC pourrait accroitre leur transport le long des bassins versants et accentuer leur concentration vers l'aval. De plus, localement, la chimie de l'eau pourrait influencer l'écotoxicité des NPC, de manière inhérente à leurs caractéristiques physico-chimiques.

Néanmoins, le devenir des NPC dans les écosystèmes d'eau douce souffre actuellement d'un manque de connaissance de par la rareté des données disponibles, ainsi que d'une limitation quant aux techniques de détection et de quantification des NPC dans des milieux complexes (cf. § 3.3.). De plus, lorsque la quantification des émissions des NPC est entreprise, les mesures ne sont pas jugées significatives par comparaison aux niveaux naturellement retrouvés dans l'environnement, ce qui soulève la question de l'identification et de l'effet des NPC manufacturées parmi l'ensemble des nanocarbones (Arvidsson *et al.*, 2013; Koelmans *et al.*, 2009).

3.3. Détection et quantification des NPC

Malgré certaines estimations des volumes de NPC émises dans l'environnement, beaucoup d'incertitudes demeurent quant à leurs quantités réellement rejetées (Gordon *et al.*, 2014; Keller *et al.*, 2013). Très peu de données sont disponibles, et qui plus est, la mesure des concentrations en NPC dans les écosystèmes aquatiques (eau et sédiment) est pour l'instant infructueuse faute de verrous technologiques (Petersen *et al.*, 2011), bien que certaines techniques de détection soient prometteuses (Doudrick *et al.*, 2015, 2012). L'analyse qualitative et quantitative des NPC est confrontée à plusieurs obstacles, à commencer par des seuils de détections adaptés à des concentrations réalistes en conditions environnementales (Doudrick *et al.*, 2015; Hristozov *et al.*, 2014; Irin *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2011). Les techniques avec un seuil de détection très bas requièrent un équipement spécial ou une expertise particulière, ce qui freine leur accessibilité et leur standardisation à l'heure actuelle. De plus, les modifications des NPC après avoir été libérées dans l'environnement (agglomération, adsorption, etc.) et les effets de matrices sont une source de biais pour beaucoup de techniques (Petersen *et al.*, 2016). Parmi les nombreuses méthodes développées pour détecter et quantifier les NPC dans l'environnement, quatre groupes se distinguent : celles se servant des caractéristiques thermiques et spectroscopiques uniques des NPC (permettant de les distinguer des autres composés carbonés de la matrice), celles utilisant la présence d'impuretés métalliques (associés aux NPC pendant leur synthèse), celles ayant recours à des NPC enrichis ou appauvris en isotopes (carbone-14 ou carbone-13), et enfin, les techniques de microscopies. A ce jour, la plupart de ces techniques ne parviennent pas à quantifier les NPC dans des matrices biologiques ou des milieux abiotiques complexes (à l'exception de la détection de NPC radioactifs, mais qui n'est applicable qu'en laboratoire) (Petersen *et al.*, 2016). Par ailleurs, certaines d'entre elles peuvent conduire à des interprétations biaisées, comme les images de microscopie montrant des NPC, ceux-ci ayant pu être déplacés à l'intérieur des échantillons lors de leur préparation (Bourdiol *et al.*, 2013; Petersen *et al.*, 2011). Quant au dosage indirect des NPC *via* leur contenu en métaux, encore faut-il connaitre la nature et la concentration des éléments métalliques ayant servi à leur synthèse. De plus, ces métaux pourraient être libérés des NPC sous certaines conditions physico-chimiques (pH acide notamment). Néanmoins, la quantification des fullerènes est désormais possible dans des matrices aqueuses complexes (Chen *et al.*, 2008). Ainsi, trois types de fullerènes ont pu être quantifiés dans des effluents de stations d'épuration, montrant des concentrations fortement variables entre les sites (de 0,5 à 67000 $ng.L^{-1}$) (Farré *et al.*, 2010). Malgré une origine inconnue, ces concentrations

augmentaient parallèlement au degré d'anthropisation, soulignant le risque qu'une quantité non négligeable de NPC issues de l'activité humaine puisse déjà être présente dans l'environnement.

Pour compenser le manque de mesures disponibles, il est parfois fait appel à des modèles pour estimer les concentrations environnementales en NPC. Dans les écosystèmes aquatiques, Gottschalk, Sun, & Nowack (2013) rapportent que les concentrations des nanoparticules manufacturées seraient situées entre approximativement 10^{-5} et 10^{-3} µg.L^{-1} dans les eaux de surfaces, contre approximativement 10^{1} à 10^{3} µg.kg^{-1} dans les sédiments. Plus récemment, Sun, Gottschalk, Hungerbühler, & Nowack (2014) ont obtenu les mêmes tendances via la modélisation des concentrations des NTC dans l'eau (environ 0,23 ng.L^{-1}) et dans les sédiments (0,79 µg.kg^{-1}.an^{-1}). Bien qu'ils n'aient pas pu être vérifiés expérimentalement, ces modèles s'accordent sur la prédiction d'une concentration plus forte des NPC dans les sédiments que dans l'eau. Ceci peut s'expliquer par la sédimentation des NPC suite à leur agglomération, de même que par le renouvellement permanent de l'eau dans le cas des milieux lotiques (Gottschalk *et al.*, 2013; Schierz *et al.*, 2014). Ainsi, les organismes benthiques seraient directement exposés à des concentrations plus fortes que les organismes pélagiques.

3.4. (Bio)Dégradation des NPC

La persistance d'une substance est un autre paramètre d'intérêt pour déterminer son risque environnemental. Ainsi, les nanoparticules de carbone (en particulier sous leur forme brute) sont décrites comme chimiquement stables et non biodégradables (Guo et Dong, 2011). Malgré tout, leur forme physique peut être modifiée et adopter des configurations plus compactes, ce qui pourrait alors réduire leur surface « visible » et potentiellement affecter leur devenir environnemental et leur toxicité (Geim et Novoselov, 2007). Relativement peu d'études se sont intéressées à la dégradation ou à la biodégradation des nanoparticules de carbone. Cependant, des travaux menés ces dernières années ont découvert que l'activité de la peroxydase pourrait causer leur dégradation oxydative dans les systèmes biologiques (Kotchey *et al.*, 2013). A l'échelle cellulaire, un processus de biodégradation a été démontré pour les nanotubes de carbone (Andón *et al.*, 2013; Russier *et al.*, 2011) et le graphène (Kotchey *et al.*, 2011). Les mécanismes responsables de cette dégradation *in situ* et de ces conséquences à court ou long terme chez les organismes ne sont pas encore connus. Cependant, il ressort de ces études que les NPC seraient plus facilement biodégradables au niveau des régions fonctionnalisées de manière covalente, c'est-à-dire présentant des défauts de structure graphénique sp^2 (cf. § 2.4.2.).

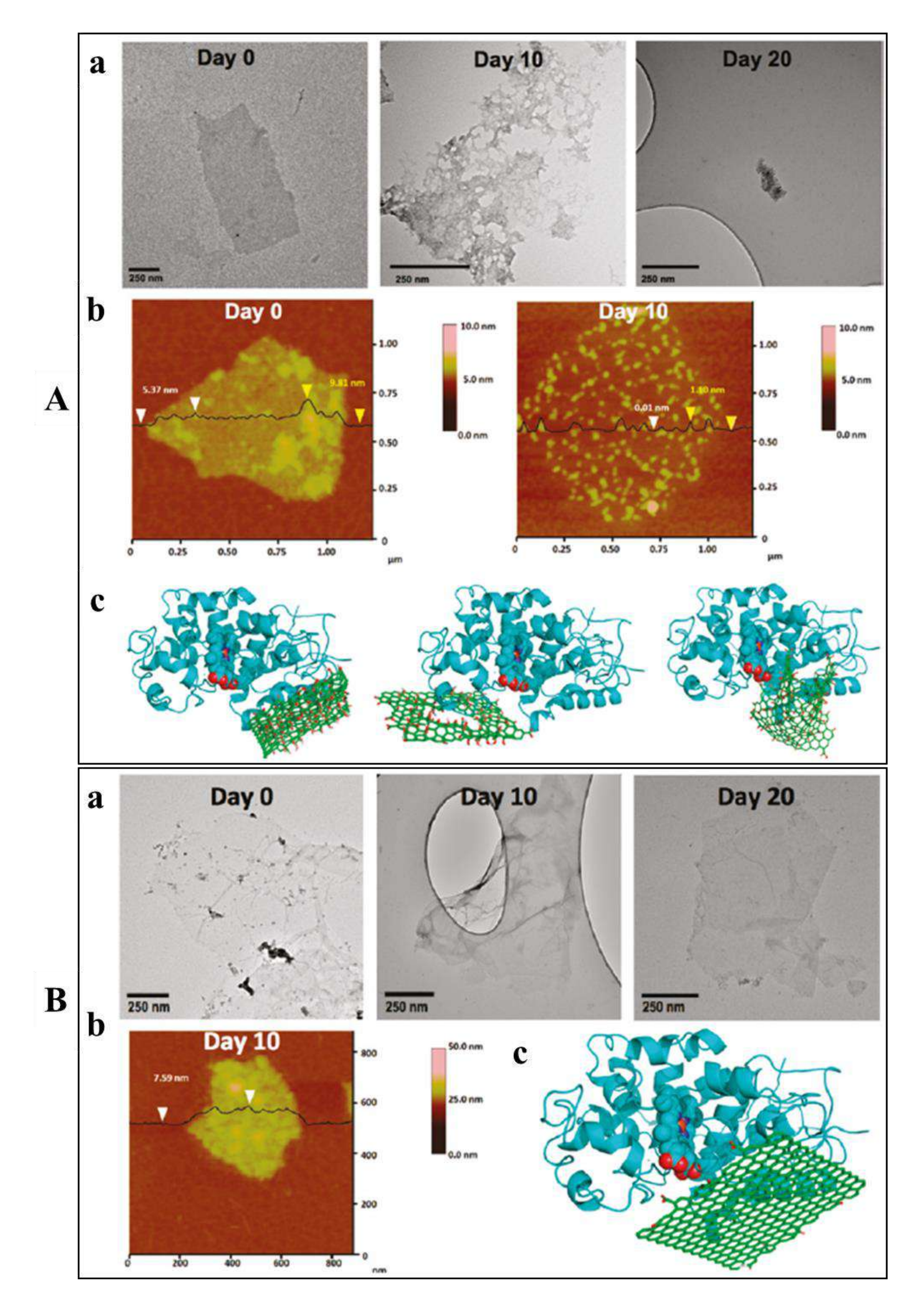


Figure 10. (a) Observations au microscope électronique à transmission du GO (A) et du rGO (B) après 0, 10 et 20 jours d'incubation avec la peroxydase de raifort et 40 µM de H_2O_2. (b) Images de microscopie à force atomique avec des analyses de section du GO (A) et du rGO (B). En présence de peroxydase, le GO (A) montre une épaisseur de feuillet de 5,37 et 9,81 nm. Au bout de 10 jours, le GO troué montre une épaisseur de feuillet de 1,10 nm, et les trous sont mis en évidence à une hauteur de 0,01 nm. Le rGO (B) conserve quant à lui une épaisseur de feuillet de 7,59 nm en présence de l'enzyme. (c) Représentation de l'association entre la peroxydase et (A) de gauche à droite, le GO, le GO troué, et un petit feuillet de GO, ou (B) le rGO (d'après Kotchey *et al.*, 2011).

La Figure 10 donne pour exemple l'action de la peroxydase de raifort *in vitro* sur le GO et le rGO, en présence de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène (~40 µM). Il apparait que l'enzyme dégrade le GO, comme en atteste la formation de trous à sa surface, tandis qu'elle ne parvient pas à oxyder chimiquement le rGO. Ceci serait lié à la position du site actif de l'enzyme, plus proche du GO que du rGO lorsque l'enzyme s'y fixe (Kotchey *et al.*, 2011).

Bien qu'essentielles pour la compréhension des mécanismes de biodégradation, les études *in vitro* ne permettent pas de rendre compte de la réelle efficacité de ces enzymes en conditions naturelles. Très peu d'études sont actuellement disponibles sur la capacité de cellules phagocytaires ou de tissus à induire spécifiquement la dégradation des NPC après leur administration *in vivo* dans des modèles animaux (Girish *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2013). Après une longue période de contact, et en présence d'une source de carbone organique, certaines bactéries seraient capables de dégrader des NTC en différents produits intermédiaires (Zhang *et al.*, 2013), alors que d'autres au contraire n'en semblent pas capables (Kümmerer *et al.*, 2011). D'une manière générale, ces études mettent en avant le risque d'une forte rémanence des NPC dans l'environnement.

4. Effets des NPC sur le vivant

Le risque posé par un contaminant est défini par sa toxicité intrinsèque (le danger qu'il représente) et sa biodisponibilité (directement liée à son exposition). L'émission et le devenir des NPC dans l'environnement sont des paramètres clés à prendre en compte dans la détermination de leur écotoxicité. Ces paramètres sont, comme nous l'avons vu (cf. § 3.), encore relativement peu renseignés. En ce qui concerne l'évaluation de la toxicité des NPC, la majorité des travaux réalisés portent sur des effets relatifs à l'Homme, à travers des études sur modèles cellulaires *in vitro* (Ou *et al.*, 2016; Palomäki *et al.*, 2011). La littérature fournit également de plus en plus d'exemples d'études *in vivo* menées chez des organismes modèles, essentiellement murins (Ema *et al.*, 2017, 2016a). Cependant, encore relativement peu d'études sont réellement consacrées à l'écotoxicité des nanoparticules de carbone. Parmi elles, la plupart concernent le fullerène (Coll *et al.*, 2015; Waissi-Leinonen *et al.*, 2015).

La présente synthèse vise, dans un premier temps, à dresser un état de l'art des connaissances disponibles relatives aux effets des NPC chez divers organismes, avant de recenser les principaux mécanismes de toxicité induits. Toute proportion gardée avec les nanoparticules utilisées dans ces travaux de thèse, une attention particulière sera accordée aux matériaux de la famille du graphène (GFM, en anglais « graphene family materials) (et surtout au GO), et dans

une moindre mesure, aux nanotubes de carbone. D'autres allotropes de carbone seront également évoqués de manière succincte.

4.1. Ecotoxicité des NPC sur différents organismes : état de l'art

4.1.1. Effets des NPC chez les bactéries

Avec les végétaux et les champignons, les bactéries sont à la base des chaines trophiques. Etudier les effets des NPC chez ces micro-organismes est donc essentiel. Une activité antimicrobienne des NPC a été rapportée par plusieurs études. Les fullerènes ont par exemple été décrits comme bactéricides envers diverses bactéries comme *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Streptococcus spp* (Tegos *et al.*, 2005). De tels effets des fullerènes seraient probablement dus à l'inhibition du métabolisme énergétique après internalisation au sein des bactéries (Shvedova *et al.*, 2012), aux dommages de la chaine respiratoire, ou bien à la rupture de la membrane cellulaire (Cataldo et da Ros, 2008). D'une manière générale, l'activité antibactérienne des NPC serait la plupart du temps due à leur contact direct avec la membrane cellulaire, entrainant la mort des bactéries (Yang *et al.*, 2010). Bien-sûr, cette activité bactéricide est très dépendante des propriétés des NPC (surface spécifique, chimie de surface, etc.) et du type de microorganisme (Dizaj *et al.*, 2015). Kang, Pinault, Pfefferle, & Elimelech (2007) ont publié la première étude montrant que les SWCNT avaient une forte activité antibactérienne chez *Escherichia coli*, *via* l'endommagement de la membrane cellulaire. Les mêmes auteurs ont ensuite montré que les SWCNT avaient plus de facilité à entrer dans les bactéries que les MWCNT, ces derniers étant contraints par un diamètre plus grand. Les MWCNT se sont ainsi avérés moins toxiques que les SWCNT, la plus grande surface spécifique de ces derniers favorisant l'interaction avec la surface bactérienne (Kang *et al.*, 2008). En outre, C. Yang, Mamouni, Tang, & Yang, (2010) ont observé une augmentation de l'activité microbienne avec l'augmentation de longueur des SWCNT, en raison de leur fort taux d'agrégation avec les bactéries. Par rapport à leur équivalent brut, la fonctionnalisation par des groupes –OH et –COOH apporte aux SWCNT une activité antimicrobienne encore plus importante, que ce soit pour des bactéries gram-négatives ou gram-positives (Arias et Yang, 2009). De même, le GO et le rGO montrent une activité antimicrobienne contre *E. coli* (gram-négative) et *Staphylococcus aureus* (gram-positif) (Akhavan et Ghaderi, 2010). Les effets des GFM seraient là encore essentiellement attribués aux dommages membranaires induits par contact direct, ainsi qu'à la perturbation de l'activité métabolique (Hu *et al.*, 2010). D'autres auteurs soulignent l'importance de la chimie de surface, puisque la fonctionnalisation du GO par de la chlorophylline de zinc jouerait un rôle majeur dans son potentiel antibactérien (Azimi

et al., 2014). Néanmoins, certains auteurs rapportent au contraire une innocuité du GO chez les bactéries (E. coli), puisque dans certaines conditions, il peut favoriser la prolifération des cellules, et permettre la formation de biofilms très denses de cellules agrégées et de matériel polymérique extracellulaire (Ruiz *et al.*, 2011).

4.1.2. Effets des NPC chez les végétaux

Chez les végétaux unicellulaires comme l'algue verte *Chlorella sp.*, une exposition aux MWCNT pendant 96h peut mener à une inhibition de croissance. Comme chez les bactéries, la toxicité des NPC chez les algues serait principalement dus à des interactions avec la surface cellulaire, mais aussi à d'autres facteurs, dont l'effet d'ombrage (réduisant leur activité photosynthétique), le stress oxydatif, ou encore la séquestration des nutriments par les NPC (Cheng *et al.*, 2017; Long *et al.*, 2012). D'autres études ont permis de mettre en évidence des différences de sensibilité entre des espèces exposées aux nanotubes de carbone, *Chlorella vulgaris* montrant une inhibition de croissance dès 0,053 $mg.L^{-1}$, contre 5,5 $mg.L^{-1}$ pour *Pseudokirchneriella subcapitata* (moins sensible) (Schwab *et al.*, 2011). Chez la diatomée benthique *Nitzschia palea*, il a été montré que le graphène multi-feuillets était capable d'induire une inhibition de croissance dans les premières heures de contamination (Garacci *et al.*, 2017). Ces résultats seraient dus à la fois au contact direct avec les diatomées et à l'effet d'ombrage. Par ailleurs, les substances exo-polymériques naturellement sécrétées par les diatomées ont montré une forte interaction avec le graphène, le piégeant au fond des puits d'exposition, tandis que les diatomées pouvaient alors recommencer à croitre normalement par-dessus, même aux fortes doses, après 144h d'exposition (Garacci *et al.*, 2017).

Chez les plantes supérieures terrestres, en dépit de revêtements protégeant les organes et de parois cellulaires garantissant une certaine étanchéité, des effets nocifs des NPC peuvent se produire. Les NPC peuvent pénétrer à travers les feuilles et transiter jusqu'aux racines, ou inversement (Chichiriccò et Poma, 2015). Des études *in vitro* sur cultures cellulaires décrivent une pénétration de la membrane cellulaire par endocytose chez *Oryza sp.*, *Arabidopsis sp*. (Shen *et al.*, 2010) et *Nicotiana tabacum* (Q. Liu *et al.*, 2009). Les sensibilités des espèces se manifestant à travers leurs réponses biologiques, l'exposition des cultures cellulaires d'*Arabidopsis sp*. aux MWCNT révèle une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase, associée à une dégradation de la production de chlorophylle (Lin *et al.*, 2009), alors qu'*Oryza sp*. réagit par une augmentation des ROS (espèces réactives de l'oxygène, pour « reactive oxygen species » en anglais) et de l'apoptose (Tan *et al.*, 2009). D'autre part, les feuilles du

chou, de l'épinard et de la tomate montrent une diminution de taille après exposition au GO à 500-2000 $mg.L^{-1}$, ainsi qu'une diminution en nombre à 1000-2000 $mg.L^{-1}$ (Begum *et al.*, 2011). A l'opposé, il arrive que les NPC puissent procurer des effets bénéfiques chez les plantes, selon des mécanismes encore peu compris. Un effet stimulant des MWCNT sur l'élongation, et/ou la germination, et/ou la capacité à prélever de l'eau, et/ou le taux de fleuraison et de fructification a ainsi été observé chez l'oignon, le concombre, le blé, la moutarde, et la tomate (Chichiriccò et Poma, 2015). Chez l'épinard, après avoir pénétré la membrane des chloroplastes, Giraldo *et al.* (2014) rapportent que les SWCNT induiraient une augmentation du flux d'électrons et de l'activité photosynthétique. Enfin, l'absorption du GO par les racines chez *Vicia faba* aurait à la fois des effets bénéfiques et toxique en fonction de la concentration. Les plus fortes doses (1600 $mg.L^{-1}$) induiraient du stress oxydatif et une augmentation de la déperdition en électrolytes au détriment de la croissance (Anjum *et al.*, 2014).

4.1.3. Effets des NPC chez les animaux terrestres

Relativement peu d'études sont consacrées à l'impact des NPC chez les invertébrés. Parmi elles, les travaux menés par Jung *et al.* (2015) démontrent que le graphène exerce une toxicité dépendant de son degré d'oxydation chez *Caenorhabditis elegans*, le GO étant le plus toxique, suivi du rGO et du graphène brut. Chez le même modèle, Zhao, Wu, & Wang (2016) attribuent la reprotoxicité du GO à de l'apoptose des cellules germinales et un arrêt du cycle cellulaire, suite aux dommages à l'ADN. D'autres auteurs montrent également des effets négatifs sur la reproduction des vers de terre (*Eisenia veneta*) exposés à des MWCNT (Scott-Fordsmand *et al.*, 2008). Chez le criquet *Acheta domesticus*, le GO -pur, ou contaminé par des ions manganèse- est responsable de l'apparition d'un stress oxydatif se prolongeant 24 heures après avoir été injecté dans l'hémolymphe. Ce stress oxydatif se traduit par une activité élevée de la catalase[1] et des glutathion-peroxydases[2], suivie par une augmentation du taux de protéines HSP-70[3] (Dziewiecka *et al.*, 2016). Pour d'autres espèces, les effets semblent au contraire négligeables, tout du moins à l'état larvaire chez la mouche (*Drosophila melanosgaster*)

---

[1] La catalase est une oxydoréductase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et dioxygène : $2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O$. Le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée), est naturellement présent chez les êtres vivants, mais peut devenir toxique s'il est produit (*via* la réduction des ROS) en trop grandes quantités.

[2] La glutathion-peroxydase est une protéine enzymatique assurant la transformation des hydroperoxydes organiques de type ROOH en ROH, permettant de lutter contre les radicaux libres. Elle catalyse la réaction suivante : $2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GS\text{-}SG + 2\ H_2O$, où GSH est le glutathion réduit, et GS-SG représente le disulfure de glutathion oxydé.

[3] HSP-70 désigne une protéine de choc thermique (en anglais, « heat shock protein »), c'est-à-dire une protéine chaperonne, garante de la bonne conformation des protéines de la cellule, et les aidant à se protéger des stress externes. Le suffixe « 70 » correspond au poids moléculaire (70 kDa).

exposée aux MWCNT, SWCNT, ou au noir de carbone. A l'état adulte en revanche, les mouches montrent des problèmes de mobilité (voire une mortalité) du fait de l'adhésion des NPC à leur corps, en particulier le noir de carbone (X. Liu *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la toxicité et la biocompatibilité des NPC ont été évaluées dans de nombreuses études employant des vertébrés, en particulier pour répondre aux préoccupations relatives à la santé humaine des travailleurs exposés (par inhalation surtout) et des patients traités *via* l'administration thérapeutique de NPC. Le plus souvent, la toxicité des NPC est ainsi évaluée sur modèle murin. Quelques exemples non exhaustifs d'organes pouvant être affectés par les NPC incluent notamment les poumons et le tractus gastro-intestinal, dans lesquels il est souvent fait référence à l'agression physique occasionnée par les NPC (effet abrasif). Par exemple, il a été montré que le GO à faible dose pouvait adhérer à la surface gastro-intestinale et causer sa destruction avec ses bords « tranchants » (Fu *et al.*, 2015). Dans les poumons, la rémanence des GFM est maintenant connue pour entrainer de l'inflammation et des fibroses (Park *et al.*, 2017). La dégradation de la barrière alvéolo-capillaire peut effectivement permettre l'infiltration de cellules inflammatoires dans les poumons et stimuler la libération de cytokines inflammatoires (Duch *et al.*, 2011). De plus, à fortes doses, un blocage des vaisseaux sanguins pulmonaires aboutissant à une dyspnée et/ou à une thrombose plaquettaire peut être observé (Singh *et al.*, 2011).

D'autre part, alors que les NPC sont utilisés en neurologie, ils peuvent également présenter certains risques, comme une diminution du taux d'ARN et de la synthèse d'ADN, avec pour conséquence des effets néfastes sur le développement du tissu cérébral (Sawosz *et al.*, 2014). Par ailleurs, il a été montré que les NPC pouvaient induire des défauts de développement embryonnaire et de reproduction. Après injection de graphène dans des œufs de poule, Sawosz *et al.* (2014) ont observé une réduction de la vascularisation du cœur et de la densité en vaisseaux sanguins au bout de 19 jours. D'autres auteurs ont quant à eux observé que le GO pouvait être intégré dans le chorion des embryons de poisson zèbre et provoquer de l'hypoxie et un important retard d'éclosion (Liu *et al.*, 2014). Chez la souris, le système reproducteur du mâle ne semble pas affecté par le GO, mais la femelle gestante est sujette à des avortements, à une diminution de production de lait maternel, voire à la mort (Fu *et al.*, 2015). D'autre part, en ce qui concerne les effets des NPC sur le sang, une réaction hémolytique a pu être mise en évidence (au-delà de 75 $\mu g.mL^{-1}$ de GFM par exemple) après exposition à des particules de taille inférieure au micromètre, alors que les particules agrégées seraient moins nocives (Sasidharan *et al.*, 2012). Néanmoins, l'ensemble de ces études porte généralement sur des

effets des NPC à court terme. Ces observations gagneraient donc à être complétées par des études de toxicité chronique, et par des études portant sur d'autres organes qui sont relativement délaissés par la littérature à ce jour (foie, rate, reins, branchies, etc.).

4.1.4. Effets des NPC chez les animaux aquatiques

Dans le milieu aquatique, le comportement (dispersion/agrégation) des nanoparticules de carbone peut conditionner leur biodisponibilité pour les organismes. Les espèces pélagiques, vivant dans la colonne d'eau, et les espèces benthiques, vivant à proximité ou à l'intérieur du sédiment, peuvent ainsi être impactées par la présence de NPC. Hormis celles concernant les bactéries et les algues, très peu d'études portent sur la réponse des espèces benthiques aux nanocarbones. Parmi ces études, les travaux de Mwangi *et al.* (2012) révèlent une diminution du taux de survie et une inhibition de croissance chez l'amphipode (*Hyalella azteca*), le chironome (*Chironomus dilutus*), l'oligochète (*Lumbriculs variegatus*) et la moule (*Villosa iris*) exposés à des nanotubes de carbone à forte dose (1 $g.L^{-1}$). Ces résultats sont influencés non seulement par l'espèce, mais aussi par le type de nanotube de carbone et par l'utilisation ou pas de la dispersion par sonication. Les NTC lavés à l'acide et débarrassés de leurs impuretés métalliques ont montré une toxicité moins importante que les NTC bruts. Néanmoins, dans tous les cas, les NTC ont été retrouvés dans le tractus digestif ainsi qu'à la surface des organismes. Adsorbés sur la peau, ils pourraient occasionner des perturbations respiratoires, comme observé chez la truite arc-en-ciel juvénile (*Oncorhynchus mykiss*) exposée aux SWCNT (Smith *et al.*, 2007). L'éventuelle pénétration dans les cellules n'a pas pu être mise en évidence (Mwangi *et al.*, 2012).

Certaines espèces benthiques peuvent avoir des stades de développement pélagiques, comme le crustacé marin *Amphibalanus amphitrite*, dont les larves montrent une inhibition de mobilité, ainsi que de la mortalité, après exposition au GO (avec une CL_{50} de 0,51-0,61 $mg.mL^{-1}$) (Mesaric *et al.*, 2013). Même si les mécanismes de toxicité chez ce crustacé ne sont pas encore compris, il semblerait que la taille des particules entre en jeu, le noir de carbone, plus petit, étant moins toxique (48 h CL_{50} : 1,66-2,03 $mg.mL^{-1}$).

D'autres espèces d'invertébrés, exclusivement pélagiques, comme *Artemia salina*, ne montrent en revanche aucune toxicité aiguë après exposition au graphène, même lorsqu'il s'agrège dans l'intestin (Pretti *et al.*, 2014). Chez *Daphnia magna*, les résultats révèlent une accumulation de graphène (marqué au carbone 14) de l'ordre de 1% de la masse sèche de l'organisme (après exposition à 250 $\mu g.L^{-1}$ pendant 24 h). Ce graphène, en partie stocké dans la poche ventrale des

daphnies gravides, peut être transféré aux nouveaux nés (Guo *et al.*, 2013). Par comparaison, l'exposition de *Daphnia magna* à des SWCNT ou des MWCNT entraine également une accumulation dans l'intestin, mais aussi une immobilisation des daphnies (48h CE_{50} : 1,3 mg.L^{-1} et 8,7 mg.L^{-1}, respectivement) et de la mortalité (48h CE_{50} : 2,4 mg.L^{-1} et 22,8 mg.L^{-1}, respectivement) (Zhu *et al.*, 2009).

Certains vertébrés pélagiques, comme le poisson zèbre (*Danio rerio*), peuvent montrer une certaine résistance aux GFM dès le stade embryonnaire, malgré une large biodistribution au sein de l'organisme (Zhao *et al.*, 2014). Une autre étude utilisant le même modèle à quant à elle relevé une légère inhibition de croissance cellulaire et un léger retard d'éclosion après exposition au GO (50 mg.L^{-1}), sans qu'il y ait pour autant d'induction significative d'apoptose (Chen *et al.*, 2012). La même étude suggère de plus que les GFM apparaissent moins toxiques pour les organismes aquatiques que ne le sont les MWCNT, puisque ces derniers entrainent une forte inhibition de croissance aux mêmes concentrations chez le poisson zèbre. Chez cette même espèce et chez la truite arc-en-ciel, Du, Wang, You, & Zhao (2013) rapportent que les nanotubes de carbone peuvent occasionner des pathologies aux niveau des branchies, du foie, de l'intestin et du cerveau, de même que des défauts de développement, du stress oxydatif et une toxicité respiratoire. D'autres travaux menés cette fois chez l'amphibien (*Ambystoma mexicanum*) ont montré que, malgré une forte ingestion de nanotubes de carbone, aucune toxicité aiguë, ni chronique, ni aucune génotoxicité n'a pu être observée, et ce même aux plus fortes concentrations testées (1000 mg. L^{-1}) (Mouchet *et al.*, 2007). L'exposition des larves de l'amphibien *Xenopus laevis* aux DWCNT et aux MWCNT n'a pas non plus montré d'effet génotoxique (Mouchet *et al.*, 2010, 2008). En revanche, les plus fortes doses testées ont entrainé une inhibition de la croissance des larves, ce qui serait lié à la présence d'agglomérats de particules dans le tube digestif. Par ailleurs, des analyses en spectroscopie Raman n'ont pas permis de détecter la présence des NTC au-delà de la barrière intestinale chez cette espèce (Mouchet *et al.*, 2010). La fonctionnalisation des MWCNT par la gomme arabique ou la carboxyméthylcellulose induit une inhibition de croissance significative chez le xénope dès 10 mg.L^{-1}, alors que leur équivalent brut ne produit cet effet qu'à 50 mg.L^{-1} (Bourdiol *et al.*, 2013). Ce résultat serait lié à la dispersion des particules, favorisée en présence de polymères, permettant un contact prolongé avec les organismes dans la colonne d'eau, avant de sédimenter. De plus, en présence de carboxyméthylcellulose, les MWCNT ont un effet génotoxique à 1 et 10 mg.L^{-1}, qui pourrait être lié à du stress oxydatif. Par contre, à 50 mg.L^{-1}, la génotoxicité n'est plus exprimée, en relation avec l'inhibition des divisions cellulaires à cette concentration,

celles-ci étant indispensables à la formation d'anomalies chromosomiques comme les micronoyaux (Bourdiol *et al.*, 2013). Quant au graphène multi-feuillets, d'autres travaux ont montré qu'il était seulement toxique pour la croissance des larves de xénope dès 10 mg.L^{-1}, sans présenter de génotoxicité ni de létalité (Muzi *et al.*, 2016).

4.2. Ecotoxicité des NPC dans un écosystème aquatique complexe

De nombreux facteurs peuvent conditionner l'écotoxicité des NPC au sein de matrices environnementales complexes, incluant les caractéristiques intrinsèques des NPC, leur comportement en solution, mais aussi leur transformation et (bio)dégradation. Les résultats de toxicité issus d'essais monospécifiques peuvent être rassemblés afin d'alimenter des modèles mathématiques capables de prédire des concentrations sans effet (PNEC, en anglais « predicted no effect concentration ») pour l'ensemble des organismes. Ainsi, Coll *et al.* (2015) ont déterminé des PNEC de 55,6 µg.L^{-1} (39,9-78,0) et de 3,84 µg.L^{-1} (2,7-5,3) pour les NTC et les fullerènes, respectivement. Au moyen d'une approche similaire, Garner *et al.* (2015) rapportent des valeurs allant de 0,2 à 5 mg.L^{-1} correspondant à la concentration pour laquelle 5% des espèces devraient être impactées, pour ces mêmes NPC. A ce jour, aucune valeur de PNEC n'a été calculée pour les GFM à notre connaissance. Cependant, au vue des valeurs de PNEC des NTC et des fullerènes, l'effet environnemental des NPC parait relativement limité.

Outre les approches écotoxicologiques classiques employant une seule espèce (essais monospécifiques), l'évaluation des risques environnementaux liés aux NPC souffre d'un certain manque de réalisme. Notamment, les notions de biotransformation, bioaccumulation et biomagnification sont généralement ignorées alors qu'elles seraient pertinentes dans toute entreprise d'études écotoxicologiques. Aussi, la mise en place de systèmes d'exposition plus complexes commence à prendre son essor pour évaluer l'effet des nanoparticules, en particulier à travers la création de micro- ou mésocosmes et la reconstitution de chaines trophiques expérimentales (Auffan *et al.*, 2014; Bour *et al.*, 2015a; Mottier *et al.*, 2017). De tels systèmes offriraient des conditions expérimentales plus proches de celles existant dans les écosystèmes naturels, bien qu'en contrepartie ils ne permettent qu'un contrôle limité des paramètres biotiques et abiotiques. Ces systèmes complexes faisant intervenir des interactions interspécifiques (par exemple, prédation et compétition) ont été utilisés pour évaluer l'effet de diverses nanoparticules (Baudrimont *et al.*, 2017; Bour *et al.*, 2016, 2015b, Buffet *et al.*, 2013, 2014). Cependant, seulement une étude à notre connaissance concerne les NPC (Schierz *et al.*, 2014). Cette étude met en évidence la faible mobilité et biodisponibilité des SWCNT dans la

colonne d'eau, ainsi qu'une absence de bioaccumulation dans les plantes aquatiques et les poissons tout au long des 10 mois d'incubation. Même si l'ingestion de SWCNT a été observée chez les poissons, les particules sont restées confinées dans le tractus digestif avant d'être rapidement excrétées. Aussi, dans les conditions expérimentales utilisées (et à 2,5 $mg.L^{-1}$ de SWCNT), les nanotubes de carbone sembleraient relativement inertes. Par contre, après leur rapide hétéro-agrégation et sédimentation, une forte persistance des SWCNT a été observée dans les sédiments. L'étude n'a malheureusement pas fait intervenir d'organismes bioturbateurs qui auraient pu remobiliser les particules. De plus, la chaîne trophique choisie par les auteurs est herbivore (biofilm, plantes aquatiques/semi-aquatiques, et poissons), alors qu'une chaine trophique avec plus de maillons (incluant des prédateurs) pourrait plus facilement mettre en évidence un risque de bioaccumulation pour les maillons supérieurs. Ainsi, une substance hydrophobe est davantage susceptible d'être bioaccumulée par les organismes, et biomagnifiée le long de la chaine trophique si les organismes en question sont consommés par d'autres (van Leeuwen et Vermeire, 2007). Ainsi, les maillons les plus élevés de la chaine trophique seraient les plus exposés aux nanoparticules de carbone, connues pour leur hydrophobicité en absence de fonctionnalisation (Guo et Dong, 2011; Wu *et al.*, 2007). Le risque lié à la bioaccumulation ne doit donc pas être écarté.

4.3. Organismes vivants *vs* nanoparticules de carbone : quelles interactions ?

Les nanoparticules de carbones sont susceptibles de franchir les barrières biologiques ou les structures cellulaires selon différentes voies, pouvant générer de la toxicité. Les voies potentielles d'entrée de ces NPC dans les organismes, leur distribution tissulaire et leur excrétion, de même que leur intégration ou non au niveau cellulaire, vont déterminer leur degré de toxicité (Ou *et al.*, 2016). Aussi, l'évaluation de la toxicité des NPC passe avant tout par la compréhension de ces phénomènes.

4.3.1. Biocompatibilité des NPC

4.3.1.1. Voies d'entrée des NPC dans les organismes et rôle des barrières biologiques

Les voies d'entrées naturelles d'un xénobiotique dans un animal sont l'ingestion, l'inhalation, et la voie cutanée. De ce fait, certaines études toxicologiques sur modèles animaux reproduisent ce schéma « naturel » (réaliste) de contamination par simple mise en contact des NPC avec les organismes (ceux-ci évoluant dans un milieu contaminé, ou en présence de nourriture contaminée). D'autres choisissent d'administrer les NPC par injection (intraveineuse,

intrapéritonéale, sous-cutanée), administration orale, ou insufflation (intranasale, intratrachéale) afin de répondre à des objectifs différents (par exemple, étudier la biocompatibilité des NPC et leur distribution après s'être assuré de la dose exacte introduite dans l'organisme). Par exemple, après instillation intratrachéale chez la souris, Zhang *et al.* (2011) ont montré que les GFM étaient retenus dans les poumons pendant plus de trois mois, avec une élimination très lente. Après injection intraveineuse, c'est dans le foie, les poumons, la rate et la vessie qu'ils s'accumuleraient (Singh *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011). L'absorption intestinale des NPC serait quant à elle limitée après administration orale, et ils seraient alors rapidement excrétés (Fu *et al.*, 2015; Mouchet *et al.*, 2010, 2008). D'autres études ont montré qu'après injection intrapéritonéale, l'oxyde de graphène restait principalement accumulé à proximité du site d'injection, tandis que de petits agglomérats pouvaient être retrouvés dans la membrane séreuse du foie et de la rate (K. Yang *et al.*, 2013). D'autre part, aucune étude à notre connaissance n'a rapporté d'éventuels transferts cutanés des NPC.

De par leur échelle nanométrique, les NPC sont susceptibles de franchir différentes barrières physiologiques, à commencer par la muqueuse pulmonaire, qui est la voie la plus exposée chez les travailleurs produisant ou utilisant des nanocarbones. Les NPC inhalées peuvent endommager l'ultrastructure et les propriétés biophysiques du surfactant pulmonaire, alors que ce dernier est essentiel à la fonction respiratoire (Hu *et al.*, 2015). Une fois déposées au fond des alvéoles pulmonaires, les nanoparticules peuvent être prises en charge par des macrophages (Gosens *et al.*, 2010), ou éliminées par le mucus respiratoire *via* l'action des cellules ciliées (Geiser et Kreyling, 2010), ou encore, pour les plus petites d'entre elles, franchir l'épithélium pulmonaire et se retrouver dans le liquide interstitiel (Kreyling *et al.*, 2013).

Au niveau du tractus digestif, aucune étude à notre connaissance n'a pu mettre en évidence un éventuel passage des NPC au-delà de la barrière intestinale, après ingestion par différents organismes (J. Edgington *et al.*, 2010; Lagier *et al.*, 2017; Mohan *et al.*, 2010; Mouchet *et al.*, 2010; K. Yang *et al.*, 2013). Ceci tendrait à souligner l'efficacité de cette barrière pour faire obstacle aux NPC, ou tout du moins pour limiter leur transfert, puisqu'aucune preuve formelle de leur absence au-delà de la barrière intestinale n'a pu être établie. Les CNP ingérés sont généralement rapidement excrétés.

D'autres barrières biologiques sont également mentionnées dans la littérature, bien qu'elles recueillent relativement peu de données à ce jour, telles que la barrière céphalique. Il a par

exemple été montré que le rGO (d'un diamètre moyen de 342 ± 23,5 nm) était capable, au bout d'un certain temps, de s'insérer dans la fente inter-endothéliale et de diminuer l'étanchéité paracellulaire de la barrière hémato-encéphalique (Mendonça *et al.*, 2015). Chez les mammifères, le placenta ne représenterait pas une barrière étanche contre le transfert des nanoparticules carbonées au fœtus (Ema *et al.*, 2016b). Le passage des NPC à travers les barrières biologiques représente toujours un défi à l'heure actuelle pour ce qui est de sa détection et de sa quantification, pour les raisons précédemment évoquées (cf. § 3.). L'étude systématique de ces barrières serait pourtant importante dans toute approche écotoxicologique, mais à ce jour, les mécanismes par lesquels les NPC franchissent ces barrières ne sont pas encore bien compris.

4.3.1.2. Distribution des NPC dans les tissus et les cellules

L'absorption des NPC, leur distribution et leur excrétion peuvent être influencées par des facteurs variés, incluant la voie d'entrée de ces particules dans l'organisme, mais aussi les propriétés physico-chimiques des NPC ainsi que leur « enrobage ». Les résultats tenant compte de ces facteurs s'avèrent très contradictoires et bien peu prédictibles. Ils semblent en effet propres à chaque nanoparticule testée, chaque type de particule -et même chaque lot- pouvant présenter des spécificités uniques. Le problème du manque d'uniformisation[1] d'un type de NPC se pose alors pour évaluer ses effets (par exemple, il existe de nombreuses nanoparticules aux caractéristiques physico-chiques différentes pourtant regroupées sous le même nom de GO). Par exemple, Zhang *et al.* (2011) ont trouvé que le GO était principalement piégé au niveau des poumons chez la souris, alors que Li *et al.* (2011) ont observé son accumulation dans le foie. Il apparait que les petits feuillets de GO (de 10 à 30 nm de diamètre) étaient essentiellement retrouvés dans le foie et la rate, alors que les plus grands feuillets de GO (10 à 800 nm) s'accumulaient principalement dans les poumons (Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). De plus, un revêtement de biomolécules sur le GO influence également sa biodistribution de par sa nature et sa charge (Ou *et al.*, 2016; K. Yang *et al.*, 2013). Les feuillets de GO supérieurs à 200 nm seraient piégés par la filtration de la rate, mais les plus petites particules (environ 8 nm) pourraient quant à elles transiter par les reins jusque dans l'urine et être éliminées sans causer

[1] Cela comprendrait par exemple les mêmes (exactement) caractéristiques physico-chimiques pour tous les NPC d'un même type, et également la même distribution de taille pour des particules de lots différents. Ceci n'est pas envisageable dans les conditions actuelles de production et de recherche. Ainsi, cela ajoute en complexité à l'analyse (éco)toxicologique des NPC et à l'interprétation et à l'extrapolation de leurs effets.

de toxicité (Li *et al.*, 2014). Les voies d'élimination du graphène *in vivo* sont aussi controversées, bien que les voies rénales et fécales semblent être les principales.

Le passage des NPC dans les cellules est aussi déterminé par leurs caractéristiques (taille, forme, enrobage, charge, diamètre hydrodynamique, etc.) (Ou *et al.*, 2016). Des nanotubes de carbone fonctionnalisés de 1 nm de diamètre et de 300-1000 nm de long sont capables de franchir la membrane cellulaire pour venir s'accumuler dans le cytoplasme ou atteindre le noyau (Pantarotto *et al.*, 2004). Certains auteurs suggèrent même que l'internalisation cellulaire de nanotubes de carbone fonctionnalisés serait indépendant de leurs groupes fonctionnels et du type cellulaire (Kostarelos *et al.*, 2007). Pour ce qui est des GFM, ceux de diamètre inférieur à 100 nm pourraient directement franchir la membrane cellulaire, et ceux de diamètre inférieur à 40 nm pourraient entrer dans le noyau (Mytych et Maciej, 2013). De plus grandes particules pourraient néanmoins entrer dans les cellules par d'autres moyens, à l'instar du GO, qui enrobé de protéines, est susceptible d'entrer dans les cellules par phagocytose (pour un GO de diamètre de l'ordre de 1 μm) ou par endocytose clathrine-dépendante (pour un GO de diamètre de l'ordre de 500 nm). Il a aussi été montré que le rGO pouvait adhérer à la bicouche lipidique de la membrane cellulaire du fait des interactions hydrophobes entre cette dernière et ses domaines graphéniques (Kostarelos et Novoselov, 2014; Sasidharan *et al.*, 2011). Par conséquent, ceci suggère qu'une exposition prolongée à des NPC hydrophobes pourrait endommager la membrane cellulaire et provoquer une déstabilisation des faisceaux d'actine et du cytosquelette. Enfin, il a également été démontré que les corona de protéines (en particulier celles contenant de l'immunoglobuline G) englobant les NPC pouvaient promouvoir leur reconnaissance par les macrophages et ainsi induire la phagocytose (Yue *et al.*, 2012). Après internalisation, les NPC peuvent s'accumuler dans le cytoplasme et le noyau, ce qui, en activant les voies métaboliques mitochondriales, induirait de la cytotoxicité par augmentation des espèces réactives de l'oxygène et/ou de l'apoptose (Y. Li *et al.*, 2012).

4.3.2. Origines et mécanismes de la toxicité des NPC

L'entrée des nanoparticules au sein des organismes est à l'origine de la toxicité qu'elles peuvent engendrer. Pourtant, la présence et/ou la bioaccumulation de ces particules n'est pas nécessairement synonyme d'effet toxique (Bour *et al.*, 2016). A l'échelle d'une population ou d'un organisme, les mécanismes de toxicité sont relativement difficiles à évaluer. A des échelles d'organisation inférieures, les résultats de toxicité fournis par différents modèles (différentes lignées cellulaires, différentes conditions) peuvent s'avérer contradictoires. Selon le dosage, le

type de nanoparticule carbonée, et la lignée cellulaire, il est possible d'observer des effets protecteurs des NPC (Ruiz *et al.*, 2011), ou au contraire une induction de la mortalité cellulaire (Akhavan *et al.*, 2012). Pour ce qui est de la cytotoxicité observée, de nombreuses études mentionnent le potentiel des NPC à induire des lésions de la membrane cellulaire et de l'ADN, entrainant de l'apoptose (Chatterjee *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013). De nombreux facteurs physico-chimiques sont susceptibles d'influencer ces résultats. Déjà évoqués précédemment (taille, chimie de surface, etc.), l'influence de ces facteurs physico-chimiques est ici examinée en détails afin d'éclaircir la compréhension des mécanismes de toxicité des NPC.

4.3.2.1. Origines : des facteurs physico-chimiques déterminants

En premier lieu, la concentration est un facteur déterminant lorsqu'il s'agit d'évaluer les effets d'un xénobiotique. Comme pour de nombreuses substances toxiques, les NPC sont susceptibles d'induire des effets dose-dépendants que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Ema *et al.*, 2017, 2016a; Ou *et al.*, 2016). Toutefois, selon les biomarqueurs considérés, il arrive que l'effet toxique apparaisse à une concentration faible ou intermédiaire dans la gamme testée, et pas à forte dose (cf. Chapitre 4 et 5).

Bien-sûr, la taille des particules est un autre paramètre crucial à prendre en compte. Théoriquement, des nanoparticules de taille inférieure à 100, 40 et 35 nm pourraient, respectivement, entrer dans les cellules, les noyaux, et franchir la barrière céphalique (Mytych et Maciej, 2013). Par exemple, Liu *et al.* (2013) ont trouvé que le GO (de 148 à 588 nm) n'entrait pas dans les cellules A549 et n'induisait pas de cytotoxicité. De plus, pour une gamme de tailles allant de 100 à 500 nm, les nanoparticules les plus petites sont celles qui causent généralement le plus d'effets délétères, alors qu'une fois sous le seuil de 40 nm, les plus petites particules seraient les moins nocives. Ainsi, le rGO de diamètre 3,8 nm ne montre pas de génotoxicité dans les cultures cellulaires, tandis que le rGO de diamètre 11,4 nm peut induire des aberrations chromosomiques (Akhavan *et al.*, 2012). La réponse inflammatoire serait également modulée par la taille des nanoparticules, les plus grandes pouvant s'avérer réfractaires à la phagocytose et activer des voies de signalisation comme NF-κB[1] en interagissant avec des récepteurs membranaires, alors que les plus petites seraient davantage internalisées par les cellules (Ma *et al.*, 2015).

[1] NF-κB (en anglais, « nuclear factor-kappa B ») est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. Son activation déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau.

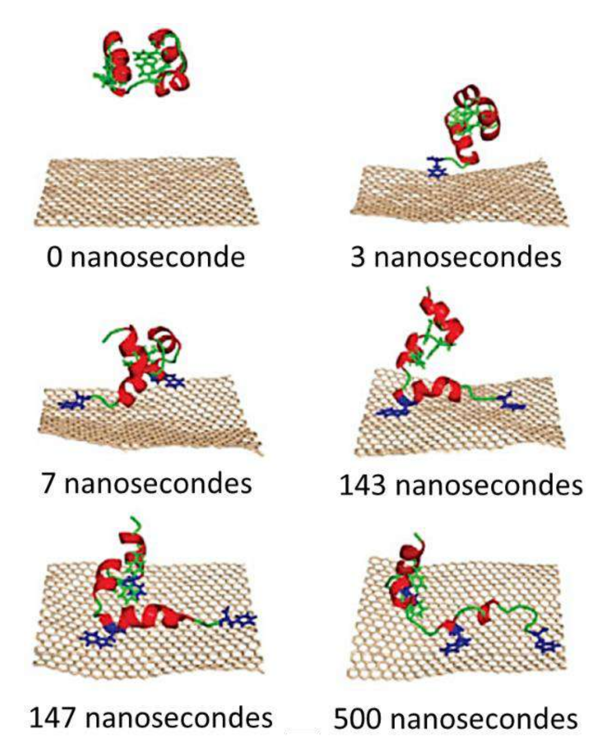


Figure 11. Représentation schématique de l'adsorption de HP35 sur un feuillet de graphène à différents temps (de 0 à 500 nanosecondes). La protéine est représentée avec des hélices rouges et des boucles vertes, tandis que ses résidus aromatiques formant les interactions π-π avec le graphène sont représentés en bleu (d'après Zuo *et al.*, 2011).

Autre critère essentiel pour évaluer l'impact écotoxicologique des nanoparticules carbonées : leur chimie de surface. La surface des NPC brutes est hydrophobe, ce qui peut, par interaction avec d'autres structures hydrophobes retrouvées sur certaines régions protéiques, modifier la structure et la fonction de la protéine en question (Zhou et Gao, 2014; Zuo *et al.*, 2011). Un exemple d'interaction du graphène avec HP35 (un domaine protéique de la villine couramment étudié dans les dynamiques moléculaires de par sa petite taille) est illustré par la Figure 11. A la lumière de cet exemple, l'interaction des NPC avec des constituants biologiques pourrait entraver l'activité de certaines protéines et donc porter atteinte aux fonctions physiologiques qui en dépendent.

De plus, suite à l'observation de la perturbation des structures cellulaires externes (bicouche lipidique et protéines associées) par les GFM, certains auteurs suggèrent que de fortes interactions moléculaires reposant sur la chimie de surface entrent en jeu. Par exemple, le rGO, dont la surface est relativement hydrophobe (intermédiaire entre le graphène brut et le GO), se lierait aux membranes cellulaires, stimulerait des récepteurs et activerait le métabolisme mitochondrial et l'apoptose (Chatterjee *et al.*, 2014). Du fait de sa surface plus hydrophile, le GO n'induirait pas le même type de réaction et s'avèrerait moins toxique, de ce point de vue (Jarosz *et al.*, 2016; Sasidharan *et al.*, 2012). Du fait de ses fonctions hydrophiles, il pourrait

par contre être plus facilement internalisé et pris en charge par les cellules. Par ailleurs, en relation avec les fonctions présentes à leur surface, la charge des particules pourrait affecter leur entrée dans les cellules (Yue *et al.,* 2011). Effectivement, en dehors des cellules phagocytaires, la répulsion électrostatique entre les charges négatives de la membrane cellulaire et de la surface du GO devrait théoriquement rendre négligeable son internalisation cellulaire (Yue *et al.*, 2012). Pourtant d'autres études suggèrent le contraire, par le biais de liaisons avec des sites cationiques présent à la surface de la cellule (Chatterjee *et al.*, 2014; Jarosz *et al.*, 2016; Yue *et al.*, 2011). A côté des fonctions oxygénées, d'autres fonctions covalentes (organiques) sont susceptibles de nuancer la toxicité des NPC. La plupart du temps, cette fonctionnalisation permet de diminuer leur toxicité et d'améliorer leur biocompatibilité au sein des organismes, par rapport aux particules ne bénéficiant pas de cette fonctionnalisation (Chang *et al.*, 2011; Li *et al.,* 2014; Yang *et al.,* 2011). Malgré tout, cette apparente « innocuité » (ou moindre toxicité) reste à démontrer à long terme. De plus, la fonctionnalisation peut aussi jouer sur la biodisponibilité des nanoparticules, et ainsi, selon le mode d'exposition et l'organisme concerné, offrir plus de risques aux NPC d'être intégrées dans l'organisme (cf. Chapitre 4). Il en va de même pour la fonctionnalisation non-covalente, qui par effet corona avec des protéines biologiques, détermine la biocinétique et la toxicité des NPC *in vivo* (Ou *et al.,* 2016). Ce revêtement protéique peut diminuer la toxicité d'une nanoparticule en limitant son interaction physique avec les constituants biologiques (Ge *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2011), ou bien, par interaction avec des récepteurs membranaires, faciliter sa reconnaissance par les cellules du système immunitaire (K. Yang *et al.*, 2013). D'autre part, la chimie de surface des NPC est aussi responsable de leur cinétique d'agrégation, celle-ci pouvant jouer un rôle dans la toxicité et dans le piégeage des nutriments (Cheng *et al.*, 2017).

Enfin, la pureté des NPC est un élément clé pour interpréter leurs effets. Des contaminants métalliques, souvent introduits lors de la synthèse, pourraient en effet être responsables de la toxicité observée, plutôt que les NPC elles-mêmes. Les nanotubes de carbone sont susceptibles d'être contaminés par les catalyseurs métalliques utilisés pendant leur synthèse, tandis que les GFM peuvent contenir des intercalants résiduels et additifs chimiques (utilisés pour séparer des feuillets) non éliminés après lavage (Sanchez *et al.*, 2012). Selon le type de nanoparticule et de synthèse, la nature des contaminants métalliques peut varier. Par exemple, le GO contient généralement des taux importants de Mn^{2+} et Fe^{2+}, qui sont fortement mutagènes pour les cellules (Wu *et al.*, 2015). Lorsque le GO est produit avec un taux de pureté élevée, sa toxicité est alors diminuée (Ali-Boucetta *et al.*, 2013).

4.3.2.2. Mécanismes cellulaires et moléculaires

En dépit de connaissances de plus en plus abondantes sur les propriétés physico-chimiques et la toxicité des NPC, leurs mécanismes exacts de toxicité ne sont pas encore suffisamment bien compris. Etant donné que les NPC sont souvent utilisés sous forme non pure, ou fonctionnalisée de diverses façons, et que les membranes cellulaires sont chimiquement plus complexes qu'une simple bicouche lipidique, il est difficile d'évaluer leurs mécanismes d'action précis, ne serait-ce qu'à la surface des cellules. De plus, des résultats parfois contradictoires divisent la communauté scientifique, certaines études suggérant la biocompatibilité des NPC, d'autres assurant au contraire de leurs effets néfastes. Ces différences, naissant probablement de l'implication de différentes équipes de recherche, de la variété des modèles biologiques utilisés, des différentes caractéristiques physico-chimiques des NPC et des méthodes de caractérisation utilisées pour les obtenir, ne permettent pas encore d'établir de conclusion définitive quant à leur impact. Les effets induits par les NPC peuvent fortement dépendre des organismes et des biomarqueurs considérés. Il est ici choisi de se focaliser sur une échelle d'organisation inférieure, celle de la cellule animale, afin de comprendre quels sont les mécanismes de toxicité pouvant être impliqués. A cette échelle, la Figure 12 illustre les principaux mécanismes de toxicité des GFM, tels qu'ils sont supposés exister, après recoupement de différentes observations expérimentales. Notons que ces mécanismes sont relativement similaires à ceux pouvant survenir avec des nanotubes de carbone ou des nanoparticules sphériques (la différence de structure apportant des nuances au niveau des interactions moléculaires) (Shi *et al.*, 2008).

Au niveau de la membrane cellulaire donc, comme déjà évoqué, le passage des NPC peut s'effectuer par destruction physique de la membrane, en particulier lorsque les particules en question sont hydrophobes. Plus précisément, les interactions hydrophobes peuvent conduire les NPC à adhérer à la membrane et à l'étirer de manière anormale, ce qui se traduit par une extension des filaments d'actine et un disfonctionnement du cytosquelette (Sasidharan *et al.*, 2012). De plus, les bords des GFM peuvent agir comme des lames, s'insérer dans la membrane et la rompre, comme observé chez des bactéries (Akhavan et Ghaderi, 2010).

De plus, la toxicité des NPC se traduit très souvent par une production de ROS, menant à un stress oxydatif lorsque cette production dépasse la capacité des enzymes antioxydantes (dont la catalase, la super-oxyde dismutase, la glutathion-peroxydase). Les ROS agissent en fait comme des messagers secondaires dans de nombreuses cascades signalétiques intracellulaires, conduisant à des dommages lipidiques, de la fragmentation de l'ADN, de la dénaturation de

protéines et des disfonctionnements mitochondriaux (Chen *et al.*, 2016). Ainsi, les NPC, *via* l'action des ROS, seraient responsables de mécanismes qui constituent la première étape de phénomènes tels que l'apoptose, le vieillissement, la mutagénèse, et la carcinogénèse (Ou *et al.*, 2016).

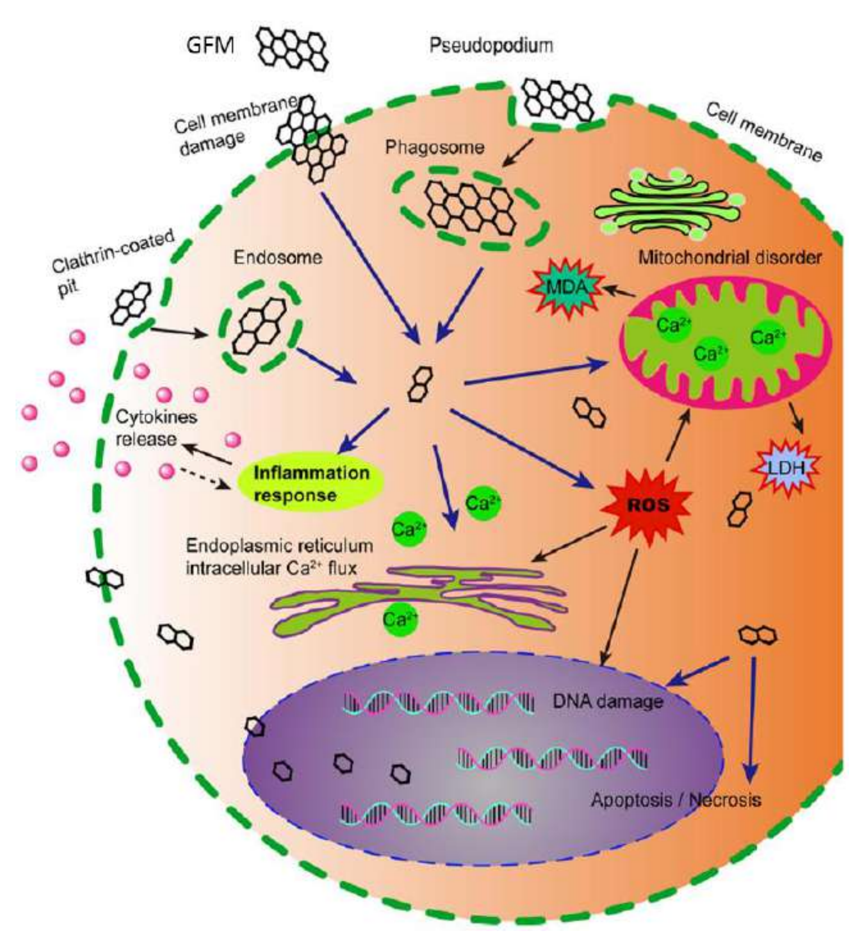


Figure 12. Représentation schématique des mécanismes potentiels de cytotoxicité des GFM. Ceux-ci pourraient entrer dans les cellules par différents moyens, et induiraient alors du stress oxydatif (génération de ROS), une augmentation de lactate déshydrogénase (LDH ; marqueur de lésion des tissus), de malondialdéhyde (MDA ; marqueur de l'action des ROS sur des acides gras polyinsaturés), et une libération de Ca^{2+}. Les GFM peuvent aussi causer des dommages à la membrane cellulaire et à l'ADN, de l'inflammation, des perturbations mitochondriales, de l'apoptose ou de la nécrose (d'après Ou *et al.*, 2016).

Au sein des cellules, les mitochondries, qui représentent des centrales énergétiques impliquées dans de nombreuses voies métaboliques, peuvent être touchées par les ROS et les NPC elles-mêmes. Après exposition aux GFM, Gurunathan *et al.* (2013) ont observé que le taux de consommation d'oxygène par les mitochondries augmentait, tandis que la membrane mitochondriale était dépolarisée, traduisant une augmentation de l'activité mitochondriale et une libération accrue de Ca^{2+} dans le cytoplasme par les mitochondries. L'augmentation de l'activité mitochondriale est en elle-même génératrice de ROS, ce qui peut accentuer les dommages causés à la cellule et mener à l'apoptose et/ou nécrose (Duch *et al.*, 2011; Park *et*

al., 2015). L'apoptose, qui se définit comme une autodestruction de la cellule régulée par des gènes *via* des processus complexes, est en effet un processus que les NPC sont connus pour induire (Chatterjee *et al.*, 2014; Duch *et al.*, 2011; Y. Li *et al.*, 2012; Matesanz *et al.*, 2013). Plusieurs voies pro-apoptotiques ont été identifiées après expositions aux NPC. Un exemple est l'activation des voies de signalisation MAPK (kinase, en anglais, « mitogen-activated protein kinases ») et TGF-β (facteur de croissance, en anglais « transforming growth factor beta ») par les ROS (Duch *et al.*, 2011; Y. Li *et al.*, 2012), ou bien l'interaction avec des protéines réceptrices conduisant à l'activation de la voie Bcl-2 (lymphome à cellules B, en anglais « B-cell lymphoma 2 ») (Ding *et al.*, 2014; Yao et Costa, 2013). Par ailleurs, la nécrose peut être induite par les NPC de façon concomitante à l'apoptose (Y. Li *et al.*, 2012). Il s'agit d'une forme alternative de mort cellulaire, induite par la réponse inflammatoire ou des lésions cellulaires. Par exemple, Qu *et al.* (2013) rapportent que le GO est capable d'induire la nécrose des macrophages par activation du récepteur TLR4 (protéine transmembranaire, en anglais, « toll-like receptor 4 »), déclenchant la production de TNF-α (facteur de nécrose tumorale, en anglais « tumor necrosis factor alpha »).

Les NPC exercent leur toxicité à travers différents mécanismes, parfois intrinsèquement liés. Un autre de ces mécanismes concerne la réponse inflammatoire, incluant entre autres l'infiltration de cellules inflammatoires et la formation de granulomes (Zhang *et al.*, 2011). Cette réponse inflammatoire peut être déclenchée par les NPC suite à la libération dans le milieu extracellulaire de cytokines[1] et chimiokines (cytokines chimio-attractantes), lesquelles vont permettre le recrutement de monocytes et stimuler la sécrétion de nouvelles cytokines, notamment Th1/Th2 (cytokines sécrétées par les lymphocytes T auxiliaires, en anglais « T helper 1 & 2 ») (Zhou *et al.*, 2012).

Enfin, les NPC sont aussi capables d'infliger des dommages à l'ADN, dont de la fragmentation chromosomique, des cassures simple ou double brin, des mutations ponctuelles, de l'intercalation entre les paires de bases, ou encore des adduits[2] à l'ADN. Ces types de dommages peuvent non seulement être à l'origine de cancers, mais aussi menacer la survie des générations futures, dans le cas où ce type d'anomalie surviendrait dans des cellules

[1] Les cytokines sont des substances solubles de signalisation cellulaire synthétisées par les cellules du système immunitaires ou par d'autres cellules, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction.

[2] En génétique moléculaire, un adduit à l'ADN résulte de la fixation d'une molécule à un site nucléophile de l'ADN par liaison covalente. Ces adduits à l'ADN peuvent modifier l'expression des gènes et participer à la carcinogénèse.

reproductrices (Ciccia et Elledge, 2010). Le GO, en particulier, peut directement infliger des aberrations chromosomiques (Chatterjee *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013). Même lorsqu'il ne peut franchir la membrane nucléaire pendant l'interphase, le GO est toujours susceptible d'atteindre l'ADN d'une cellule au moment de sa mitose, lorsque la membrane nucléaire se rompt (Magdolenova *et al.*, 2014). Les interactions π entre les atomes de carbone graphénique et les paires de bases hydrophobes de l'ADN peuvent modifier la morphologie de ce dernier, en jouant sur l'inclinaison de l'axe hélicoïdal d'un fragment d'ADN. De plus, les forces intermoléculaires sont capables de sévèrement déformer les extrémités de la molécule d'ADN, augmentant potentiellement le risque génotoxique (Zhao, 2011). L'atteinte de l'ADN est aussi possible de manière indirecte *via* le stress oxydatif ou la réponse inflammatoire, à travers l'activation de voies signalétiques intracellulaires telles que MAPK, TGF-β et NF-κB, par exemple (Chatterjee *et al.*, 2014; Jarosz *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013).

Références bibliographiques

Agnihotri, S., Rood, M.J., 2006. Adsorption site analysis of impurity embedded single-walled carbon nanotube bundles. Carbon N. Y. 44, 2376‑2383. doi:10.1016/j.carbon.2006.05.038

Ajayan, P.M., Zhou, O.Z., 2001. Applications of carbon nanotubes. In: Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Avouris P. (eds) Carbon Nanotubes, in: Topics in Applied Physics. Springer, Berlin, p. 391‑425. doi:10.1007/3-540-39947-X_14

Akhavan, O., Ghaderi, E., 2010. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. ACS Nano 4, 5731‑5736. doi:10.1021/nn101390x

Akhavan, O., Ghaderi, E., Akhavan, A., 2012. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells. Biomaterials 33, 8017‑8025. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.040

Ali-Boucetta, H., Bitounis, D., Raveendran-Nair, R., Servant, A., Van den Bossche, J., Kostarelos, K., 2013. Purified graphene oxide dispersions lack in vitro cytotoxicity and in vivo pathogenicity. Adv. Healthc. Mater. 2, 433‑441.

Andón, F.T., Kapralov, A.A., Yanamala, N., Feng, W., Baygan, A., Chambers, B.J., Hultenby, K., Ye, F., Toprak, M.S., Brandner, B.D., Fornara, A., Klein-Seetharaman, J., Kotchey, G.P., Star, A., Shvedova, A.A., Fadeel, B., Kagan, V.E., 2013. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes by eosinophil peroxidase. Small 9, 2721‑2729. doi:10.1002/smll.201202508

Anjum, N.A., Singh, N., Singh, M.K., Sayeed, I., Duarte, A.C., Pereira, E., Ahmad, I., 2014. Single-bilayer graphene oxide sheet impacts and underlying potential mechanism assessment in germinating faba bean (Vicia faba L.). Sci. Total Environ. 472, 834‑841. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.018

ANSES, 2014. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux - Enjeux et mise à jour des connaissances.

Apul, O.G., Wang, Q., Zhou, Y., Karanfil, T., 2013. Adsorption of aromatic organic contaminants by graphene nanosheets: comparison with carbon nanotubes and activated carbon. Water Res. 47, 1648‑1654. doi:10.1016/j.watres.2012.12.031

Aqel, A., Abou El-Nour, K.M.M., Ammar, R.A.A., Al-Warthan, A., 2012. Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation. Arab. J. Chem. 5, 1‑23. doi:10.1016/j.arabjc.2010.08.022

Arias, L.R., Yang, L., 2009. Inactivation of bacterial pathogens by carbon nanotubes in suspensions. Langmuir 25, 3003‑3012. doi:0.1021/la802769m

Arnold, M.C., Badireddy, A.R., Wiesner, M.R., Di Giulio, R.T., Meyer, J.N., 2013. Cerium oxide nanoparticles are more toxic than equimolar bulk cerium oxide in Caenorhabditis elegans. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 65, 224‑233. doi:10.1007/s00244-013-9905-5

Arvidsson, R., Molander, S., Sandén, B.A., 2013. Review of potential environmental and health risks of the nanomaterial graphene. Hum. Ecol. Risk Assess. 19, 873‑887. doi:10.1080/10807039.2012.702039

Asselborn, E., Chiappero, P.-J., Galvier, J., 2006. Les minéraux. Paris.

Auffan, M., Tella, M., Santaella, C., Brousset, L., Paillès, C., Barakat, M., Espinasse, B., Artells, E., Issartel, J., Masion, A., Rose, J., Wiesner, M.R., Achouak, W., Alain, T., Bottero, J.-Y., 2014. An adaptable mesocosm platform for performing integrated assessments of nanomaterial risk in complex environmental systems. Sci. Rep. 4, 1‑7. doi:10.1038/srep05608

Ávila, A.F., Lacerda, G.S.R., 2008. Molecular mechanics applied to single-walled carbon nanotubes. Mater. Res. 11, 325‑333. doi:10.1590/S1516-14392008000300016

Awasthi, K., Srivastava, A., Srivastava, O.N., 2005. Synthesis of carbon nanotubes. J. Nanosci. Nanotechnol. 5, 1616‑1636. doi:10.1166/jnn.2005.407

Azimi, S., Behin, J., Abiri, R., Rajabi, L., Derakhshan, A.A., Karimnezhad, H., 2014. Synthesis, characterization and antibacterial activity of chlorophyllin functionalized graphene oxide nanostructures. Sci. Adv. Mater. 6, 1‑11. doi:10.1166/sam.2014.1767

Basu, J., Basu, J.K., Bhattacharyya, T.K., 2013. The evolution of graphene-based electronic devices. Int. J. Smart Nano Mater. 1, 201‑223. doi:10.1080/19475411.2010.510856

Baudrimont, M., Andrei, J., Mornet, S., Gonzalez, P., Mesmer-Dudons, N., Gourves, P.-Y., Jaffal, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Geffard, O., Garric, J., Feurtet-Mazel, A., 2017. Trophic transfer and effects of gold nanoparticles (AuNPs) in Gammarus fossarum from contaminated periphytic biofilm. Environ. Sci. Pollut. Res. 1‑11. doi:10.1007/s11356-017-8400-3

Baun, A., Hartmann, N.B., Grieger, K., Kusk, K.O., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. Ecotoxicology 17, 387‑395. doi:10.1007/s10646-008-0208-y

Becerril, H.A., Mao, J., Liu, Z., Stoltenberg, R.M., Bao, Z., Chen, Y., 2008. Evaluation of solution-processed reduced graphene oxide films as transparent conductors. ACS Nano 2, 463‑470. doi:10.1021/nn700375n

Begum, P., Ikhtiari, R., Fugetsu, B., 2011. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. Carbon N. Y. 49, 3907‑3919. doi:10.1016/j.carbon.2011.05.029

Berger, C., Song, Z., Li, T., Li, X., Ogbazghi, A.Y., Feng, R., Dai, Z., Marchenkov, A.N., Conrad, E.H., First, P.N., De Heer, W.A., 2004. Ultrathin epitaxial graphite: 2D electron gas properties and a route toward graphened-based nanoelectronics. J. Phys. Chem. B 108, 19912‑19916. doi:10.1021/jp040650f

Bethune, D.S., Kiang, C.H., Vries, M.S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., Beyers, R., 1993. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. Nature 363, 605‑607. doi:10.1038/363605a0

Bianco, A., 2013. Graphene: safe or toxic? The two faces of the medal. Angew. Chemie - Int. Ed. doi:10.1002/anie.201209099

Boudou, J.-P., Curmi, P.A., Jelezko, F., Wrachtrup, J., Aubert, P., Sennour, M., Balasubramanian, G., Reuter, R., Thorel, A., Gaffet, E., 2009. High yield fabrication of fluorescent nanodiamonds. Nanotechnology 20, 235602. doi:10.1088/0957-4484/20/23/235602

Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Verneuil, L., Baqué, D., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., Pagnout, C., Clivot, H., Fourquaux, I., Tella, M., Auffan, M., Laury, G., Pinelli, E., 2016. Toxicity of CeO2 nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: a study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. Nanotoxicology 10, 245–255. doi:10.3109/17435390.2015.1053422

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015a. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review. J. Hazard. Mater. 283, 764–777. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.021

Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L., 2015b. Toxicity of CeO2 nanoparticles at different trophic levels - Effects on diatoms, chironomids and amphibians. Chemosphere 120, 230–236. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.012

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Boutonnet, J., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2013. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae. Carbon N. Y. 54, 175–191. doi:10.1016/j.carbon.2012.11.024

Bradley, K., Briman, M., Star, A., Gruner, G., 2004. Charge transfer from adsorbed proteins. Nano Lett. 4, 253–256. doi:10.1021/nl0349855

Brodie, B.C., 1859. On the atomic weight of graphite. Philos. Trans. R. Soc. London 149, 249–259. doi:10.1098/rstl.1859.0013

Brusset, H., Amiel, J., 2017. Carbone - Encyclopaedia Universalis [WWW Document]. URL http://www.universalis.fr/encyclopedie/carbone/ (consulté le 7.4.17).

Buffet, P.-E., Richard, M., Caupos, F., Vergnoux, A., Perrein-Ettajani, H., Luna-Acosta, A., Akcha, F., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Guibbolini, M., Risso-De Faverney, C., Thomas-Guyon, H., Reip, P., Dybowska, A., Berhanu, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2013. A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (Scrobicularia plana, Hediste diversicolor). Environ. Sci. Technol. 47, 1620–1628. doi:10.1021/es303513r

Buffet, P.E., Zalouk-Vergnoux, A., Châtel, A., Berthet, B., Métais, I., Perrein-Ettajani, H., Poirier, L., Luna-Acosta, A., Thomas-Guyon, H., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm Hediste diversicolor and the bivalve mollusc Scrobicularia plana. Sci. Total Environ. 470–471, 1151–1159. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.114

Cataldo, F., da Ros, T., 2008. Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-1-4020-6845-4

Ceriotti, G., Romanchuk, A.Y., Slesarev, A.S., Kalmykov, S.N., 2015. Rapid method for the purification of graphene oxide. RSC Adv. 5, 50365–50371. doi:10.1039/C5RA07604H

Chabot, V., Kim, B., Sloper, B., Tzoganakis, C., Yu, A., 2013. High yield production and purification of few layer graphene by Gum Arabic assisted physical sonication. Sci. Rep. 3, 1378. doi:10.1038/srep01378

Chang, Y., Yang, S.-T., Liu, J.-H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., Liu, Y., Wang, H., 2011. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. Toxicol. Lett. 200, 201–210. doi:10.1016/j.toxlet.2010.11.016

Chatterjee, N., Eom, H.-J., Choi, J., 2014. A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interactions. Biomaterials 35, 1109–1127. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.108

Chatterjee, N., Yang, J.S., Choi, J., 2016. Differential genotoxic and epigenotoxic effects of graphene family nanomaterials (GFNs) in human bronchial epithelial cells. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.

798‑799. doi:10.1016/j.mrgentox.2016.01.006

Chen, J., Li, Y., Huang, L., Li, C., Shi, G., 2015. High-yield preparation of graphene oxide from small graphite flakes via an improved Hummers method with a simple purification process. Carbon N. Y. 81, 826‑834. doi:10.1016/j.carbon.2014.10.033

Chen, L., Hu, P., Zhang, L., Huang, S., Luo, L., Huang, C., 2012. Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish. Sci. China Chem. 55, 2209‑2216. doi:10.1007/s11426-012-4620-z

Chen, M., Yin, J., Liang, Y., Yuan, S., Wang, F., Song, M., Wang, H., 2016. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. Aquat. Toxicol. 174, 54‑60. doi:10.1016/j.aquatox.2016.02.015

Chen, Z., Westerhoff, P., Herckes, P., 2008. Quantification of C60 fullerene concentrations in water. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1852‑1859. doi:10.1897/07-560.1

Cheng, C., Li, S., Thomas, A., Kotov, N.A., Haag, R., 2017. Functional graphene nanomaterials based architectures: biointeractions, fabrications, and emerging biological applications. Chem. Rev. 117, 1826‑1914. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00520

Chiang, I.W., Brinson, B.E., Smalley, R.E., Margrave, J.L., Hauge, R.H., 2001. Purification and characterization of single-wall carbon nanotubes. J. Phys. Chem. B 105, 1157‑1161.

Chichiriccò, G., Poma, A., 2015. Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants. Nanomaterials 5, 851‑873. doi:10.3390/nano5020851

Choi, E.-K., Jeon, I.-Y., Bae, S.-Y., Lee, H.-J., Shin, H.S., Dai, L., Baek, J.-B., 2010. High-yield exfoliation of three-dimensional graphite into two-dimensional graphene-like sheets. Chem. Commun. R. Soc. Chem. 46, 6320‑6322. doi:10.1039/c0cc00753f

Chowdhury, I., Duch, M.C., Mansukhani, N.D., Hersam, M.C., Bouchard, D., 2013. Colloidal properties and stability of graphene oxide nanomaterials in the aquatic environment. Environ. Sci. Technol. 47, 6288‑6296. doi:10.1021/es400483k

Chua, C.K., Pumera, M., 2014. Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint. Chem. Soc. Rev. 43, 291‑312. doi:10.1039/c3cs60303b

Ciccia, A., Elledge, S.J., 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. Mol. Cell 40, 179‑204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019

Ciesielski, A., Samori, P., 2014. Graphene via sonication assisted liquid-phase exfoliation. Chem. Soc. Rev. 43, 381‑398. doi:10.1039/c3cs60217f

Cioffi, C., Campidelli, S., Brunetti, F.G., Meneghetti, M., Prato, M., 2006. Functionalisation of carbon nanohorns. Chem. Commun. R. Soc. Chem. 2129‑2131. doi:10.1039/b601176d

Coll, C., Notter, D., Gottschalk, F., Sun, T., Som, C., Nowack, B., 2015. Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO2 , nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes). Nanotoxicology 5390, 1‑9. doi:10.3109/17435390.2015.1073812

Dai, H., 2002. Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. Acc. Chem. Res. 35, 1035‑1044. doi:10.1021/ar0101640

Danilenko, V. V., 2004. On the history of the discovery of nanodiamond synthesis. Phys. Solid State 46, 595‑599. doi:10.1134/1.1711431

De, S., King, P.J., Lotya, M., O'Neill, A., Doherty, E.M., Hernandez, Y., Duesberg, G.S., Coleman, J.N., 2010. Flexible, transparent, conducting films of randomly stacked graphene from surfactant-stabilized, oxide-free graphene dispersions. Small 6, 458‑464. doi:10.1002/smll.200901162

De Volder, M.F.L., Tawfick, S.H., Baughman, R.H., Hart, J.A., 2013. Carbon nanotubes: present and future commercial applications. Science (80-.). 339, 535‑539. doi:10.1126/science.1222453

Di Crescenzo, A., Ettorre, V., Fontana, A., 2014. Non-covalent and reversible functionalization of carbon nanotubes. Beilstein J. Nanotechnol. 5, 1675‑1690. doi:10.3762/bjnano.5.178

Ding, Z., Zhang, Z., Ma, H., Chen, Y., 2014. In vitro hemocompatibility and toxic mechanism of graphene oxide on human peripheral blood T lymphocytes and serum albumin. ACS Appl. Mater. Interfaces 6, 19797‑19807. doi:10.1021/am505084s

Dizaj, S.M., Mennati, A., Jafari, S., Khezri, K., Adibkia, K., 2015. Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles. Adv. Pharm. Bull. 5, 19‑23. doi:10.5681/apb.2015.003

Doudrick, K., Herckes, P., Westerhoff, P., 2012. Detection of carbon nanotubes in environmental matrices using programmed thermal analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 12246‑12253. doi:10.1021/es300804f

Doudrick, K., Nosaka, T., Herckes, P., Westerhoff, P., 2015. Quantification of graphene and graphene oxide in complex organic matrices. Environ. Sci. Nano 2, 60‑67. doi:10.1039/c4en00134f

Du, J., Wang, S., You, H., Zhao, X., 2013. Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the assessment of health risk for human: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 36, 451‑462. doi:10.1016/j.etap.2013.05.007

Duch, M.C., Budinger, G.R.S., Liang, Y.T., Soberanes, S., Urich, D., Chiarella, S.E., Campochiaro, L.A., Gonzalez, A., Chandel, N.S., Hersam, M.C., Mutlu, G.M., 2011. Minimizing oxidation and stable nanoscale dispersion improves the biocompatibility of graphene in the lung. Nano Lett. 11, 5201‑5207. doi:10.1021/nl202515a

Dziewiecka, M., Karpeta-Kaczmarek, J., Augustyniak, M., Majchrzycki, Ł., Augustyniak-Jabłokow, M.A., 2016. Evaluation of in vivo graphene oxide toxicity for Acheta domesticus in relation to nanomaterial purity and time passed from the exposure. J. Hazard. Mater. 305, 30‑40. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.11.021

Ebbensen, T.W., Ajayan, P.M., Hiura, H., Tanigaki, K., 1994. Purification of nanotubes. Nature 367, 519. doi:10.1038/367519a0

Ebbesen, T.W., Ajayan, P.M., 1992. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. Nature 358, 220‑222. doi:10.1038/358220a0

ECHA, 2014. Nanomatériaux [WWW Document]. URL https://echa.europa.eu/fr/regulations/nanomaterials (consulté le 6.27.17).

Eda, G., Chhowalla, M., 2010. Chemically derived graphene oxide : towards large-area thin-film electronics and optoelectronics. Adv. Mater. 22, 2392‑2415. doi:10.1002/adma.200903689

Ema, M., Gamo, M., Honda, K., 2017. A review of toxicity studies on graphene-based nanomaterials in laboratory animals. Regul. Toxicol. Pharmacol. 85, 7‑24. doi:10.1016/j.yrtph.2017.01.011

Ema, M., Gamo, M., Honda, K., 2016a. A review of toxicity studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals. Regul. Toxicol. Pharmacol. 74, 42‑63. doi:10.1016/j.yrtph.2015.11.015

Ema, M., Hougaard, K.S., Kishimoto, A., Honda, K., 2016b. Reproductive and developmental toxicity of carbon-based nanomaterials: a literature review. Nanotoxicology 10, 391‑412. doi:10.3109/17435390.2015.1073811

Endo, M., Strano, M.S., Ajayan, P.M., 2008. Potential applications of carbon nanotubes. In: Jorio A., Dresselhaus G., Dresselhaus M.S. (eds) Carbon Nanotubes, in: Topics in Applied Physics,. Springer, Berlin, p. 13‑62. doi:10.1007/978-3-540-72865-8_2

Ersan, G., Apul, O.G., Perreault, F., Karanfil, T., 2017. Adsorption of organic contaminants by graphene nanosheets: a review. Water Res. doi:10.1016/j.watres.2017.08.010

Falcao, E.H.L., Wudl, F., 2007. Carbon allotropes: beyond graphite and diamond. J. Chem. Technol. Biotechnol. 82, 524‑531. doi:10.1002/jctb.1693

Farré, M., Pérez, S., Gajda-Schrantz, K., Osorio, V., Kantiani, L., Ginebreda, A., Barceló, D., 2010. First

determination of C60 and C70 fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C60 on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography hybrid quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. J. Hydrol. 383, 44‑51. doi:10.1016/j.jhydrol.2009.08.016

Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A., Laurent, C., 2003. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. Chem. Commun. R. Soc. Chem. 1442‑1443. doi:10.1039/b301514a

Fraga, S., Faria, H., Elisa, M.E., Duarte, J.A., Soares, L., Pereira, E., Costa-Pereira, C., Teixeira, J.P., de Lourdes Bastos, M., Carmo, H., 2013. Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. J. Appl. Toxicol. 33, 1111‑1119. doi:10.1002/jat.2865

Fu, C., Liu, T., Li, L., Liu, H., Liang, Q., Meng, X., 2015. Effects of graphene oxide on the development of offspring mice in lactation period. Biomaterials 40, 23‑31. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.11.014

Gaffet, E., 2011. Nanomaterials: a review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development. Comptes Rendus Phys. 12, 648‑658. doi:DOI 10.1016/j.crhy.2011.06.002

Gao, J., Liu, F., Liu, Y., Ma, N., Wang, Z., Zhang, X., 2010. Environment-friendly method to produce graphene that employs vitamin C and amino acid. Chem. Mater. 22, 2213‑2218. doi:10.1021/cm902635j

Gao, Y., Li, Y., Zhang, L., Huang, H., Hu, J., Shah, S.M., Su, X., 2012. Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. J. Colloid Interface Sci. 368, 540‑546. doi:10.1016/j.jcis.2011.11.015

Garacci, M., Barret, M., Mouchet, F., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Flahaut, E., Gauthier, L., Silvestre, J., Pinelli, E., 2017. Few layer graphene sticking by biofilm of freshwater diatom Nitzschia palea as a mitigation to its ecotoxicity. Carbon N. Y. 113, 139‑150. doi:10.1016/j.carbon.2016.11.033

Garner, K.L., Suh, S., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2015. Species sensitivity distributions for engineered nanomaterials. Environ. Sci. Technol. 49, 5753‑5759. doi:10.1021/acs.est.5b00081

Ge, C., Du, J., Zhao, L., Wang, L., Liu, Y., Li, D., Yang, Y., Zhou, R., Zhao, Y., Chai, Z., Chen, C., 2016. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 16968‑16973. doi:10.1073/pnas.1105270108

Geim, A.K., Novoselov, K.S., 2007. The rise of graphene. Nat. Mater. 6, 183‑191. doi:10.1038/nmat1849

Geiser, M., Kreyling, W.G., 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. Part. Fibre Toxicol. 7. doi:10.1186/1743-8977-7-2

Georgakilas, V., Bourlinos, A., Gournis, D., Tsoufis, T., Trapalis, C., Mateo-Alonso, A., Prato, M., 2008. Multipurpose organically modified carbon nanotubes: from functionalization to nanotube composites. J. Am. Chem. Soc. 130, 8733‑8740. doi:10.1021/ja8002952

Georgakilas, V., Otyepka, M., Bourlinos, A.B., Chandra, V., Kim, N., Kemp, K.C., Hobza, P., Zboril, R., Kim, K.S., 2012. Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications. Chem. Rev. 112, 6156‑6214. doi:10.1021/cr3000412

Georgakilas, V., Perman, J.A., Tucek, J., Zboril, R., 2015. Broad family of carbon nanoallotropes: classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures. Chem. Rev. 115, 4744‑4822. doi:10.1021/cr500304f

Georgakilas, V., Tiwari, J.N., Kemp, K.C., Perman, J.A., Bourlinos, A.B., Kim, K.S., Zboril, R., 2016. Noncovalent functionalization of graphene and graphene oxide for energy materials, biosensing, catalytic, and biomedical applications. Chem. Rev. 116, 5564‑5519. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00620

Ghaffarzadeh, K., 2016. The graphene market to reach 3,800 tonnes per year in 2026 [WWW Document]. IDTechEx. URL http://www.idtechex.com/research/articles/the-graphene-market-to-reach-3-800-tonnes-per-year-in-2026-00009213.asp (consulté le 7.6.17).

Gigault, J., Grassl, B., Lespes, G., 2012. Size characterization of the associations between carbon nanotubes and humic acids in aqueous media by asymmetrical flow field-flow fractionation combined with multi-angle

light scattering. Chemosphere 86, 177–182. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.10.009

Giraldo, J.P., Landry, M.P., Faltermeier, S.M., McNicholas, T.P., Iverson, N.M., Boghossian, A.A., Reuel, N.F., Hilmer, A.J., Sen, F., Brew, J.A., Strano, M.S., 2014. Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing. Nat. Mater. 13, 400–408. doi:10.1038/NMAT3890

Girish, C.M., Sasidharan, A., Gowd, G.S., Nair, S., Koyakutty, M., 2013. Confocal raman imaging study showing macrophage mediated biodegradation of graphene in vivo. Adv. Healthc. Mater. 2, 1489–1500. doi:10.1002/adhm.201200489

Gomez-Navarro, C., Weitz, R.T., Bittner, A.M., Scolari, M., Mews, A., Burghard, M., Kern, K., 2007. Electronic transport properties of individual chemically reduced graphene oxide sheets. Nano Lett. 7, 3499–3503. doi:10.1021/nl072090c

Gordon, S.C., Butala, J.H., Carter, J.M., Elder, A., Gordon, T., Gray, G., Sayre, P.G., Schulte, P.A., Tsai, C.S., West, J., 2014. Workshop report: strategies for setting occupational exposure limits for engineered nanomaterials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 68, 305–311. doi:10.1016/j.yrtph.2014.01.005

Gosens, I., Post, J.A., de la Fonteyne, L.J.J., Jansen, E.H.J.M., Geus, J.W., Cassee, F.R., de Jong, W.H., 2010. Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. Part. Fibre Toxicol. 7. doi:10.1186/1743-8977-7-37

Gottschalk, F., Nowack, B., Gawlik, B., 2010. Development of exposure scenarios for manufactured nanomaterials - Work Package 5 - Report on exposure scenarios and release of nanomaterials to the environment (Including Deliverable D5.1).

Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. Environ. Pollut. 181, 287–300. doi:10.1016/j.envpol.2013.06.003

Grillo, R., Rosa, A.H., Fraceto, L.F., 2015. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. Chemosphere 119, 608–619. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.049

Guo, S., Dong, S., 2011. Graphene nanosheet: synthesis, molecular engineering, thin film, hybrids, and energy and analytical applications. Chem. Soc. Rev. 40, 2644–2672. doi:10.1039/c0cs00079e

Guo, X., Dong, S., Petersen, E.J., Gao, S., Huang, Q., Mao, L., 2013. Biological uptake and depuration of radio-labeled graphene by Daphnia magna. Environ. Sci. Technol. 47, 12524–12531. doi:10.1021/es403230u

Guo, X., Mei, N., 2014. Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. J. Food Drug Anal. 22, 105–115. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.009

Gurunathan, S., Han, J.W., Eppakayala, V., Kim, J.-H., 2013. Green synthesis of graphene and its cytotoxic effects in human breast cancer cells. Int. J. Nanomedicine 8, 1015–1027. doi:10.2147/IJN.S42047

Hamilton, C.E., Lomeda, J.R., Sun, Z., Tour, J.M., Barron, A.R., 2009. High-yield organic dispersions of unfunctionalized graphene. Nano Lett. 9, 3460–3462. doi:10.1021/nl9016623

Hass, J., De Heer, W.A., Conrad, E.H., 2008. The growth and morphology of epitaxial multilayer graphene. J. Phys. Condens. Matter 20. doi:10.1088/0953-8984/20/32/323202

Hernandez, Y., Nicolosi, V., Lotya, M., Blighe, F.M., Sun, Z., De, S., McGovern, I.T., Holland, B., Byrne, M., Gun'Ko, Y.K., Boland, J.J., Niraj, P., Duesberg, G., Krishnamurthy, S., Goodhue, R., Hutchison, J., Scardaci, V., Ferrari, A.C., Coleman, J.N., 2008. High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite. Nat. Nanotechnol. 3, 563–568. doi:10.1038/nnano.2008.215

Herron, C.R., Coleman, K.S., Edwardsa, R.S., Mendis, B.G., 2011. Simple and scalable route for the 'bottom-up' synthesis of few-layer graphene platelets and thin films. J. Mater. Chem. 21, 3378–3383. doi:10.1039/c0jm03437a

Hirsch, A., 2002. Functionalization of single-walled carbon nanotubes. Angew. Chemie - Int. Ed. 41, 1853–1859. doi:10.1002/1521-3773(20020603)41:11<1853::AID-ANIE1853>3.0.CO;2-N

Hong, B.J., Compton, O.C., An, Z., Eryazici, I., Nguyen, S.T., 2012. Successful stabilization of graphene oxide in electrolyte solutions: enhancement of bio- functionalization and cellular uptake. ACS Nano 6, 63–73. doi:10.1021/nn202355p

Hristozov, D.R., Gottardo, S., Cinelli, M., Isigonis, P., Zabeo, A., Critto, A., Van Tongeren, M., Tran, L., Marcomini, A., 2014. Application of a quantitative weight of evidence approach for ranking and prioritising occupational exposure scenarios for titanium dioxide and carbon nanomaterials. Nanotoxicology 8, 117–131. doi:10.3109/17435390.2012.760013

Hu, Q., Jiao, B., Shi, X., Valle, R.P., Zuo, Y.Y., Hu, G., 2015. Effects of graphene oxide nanosheets on the ultrastructure and biophysical properties of the pulmonary surfactant film. Nanoscale 7, 18025–18029. doi:10.1039/c5nr05401j

Hu, S., Tian, F., Bai, P., Cao, S., Sun, J., Yang, J., 2009. Synthesis and luminescence of nanodiamonds from carbon black. Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol. 157, 11–14. doi:10.1016/j.mseb.2008.12.001

Hu, W., Peng, C., Luo, W., Lv, M., Li, X., Li, D., Huang, Q., Fan, C., 2010. Graphene-based antibacterial paper. ACS Nano 4, 4317–4323. doi:10.1021/nn101097v

Hu, W., Peng, C., Lv, M., Li, X., Zhang, Y., Chen, N., Fan, C., Huang, Q., 2011. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. ACS Nano 5, 3693–3700. doi:10.1021/nn200021j

Hummers, W.S., Offeman, R.E., 1958. Preparation of Graphitic Oxide 80, 1339. doi:10.1021/ja01539a017

Hunter, C.A., Sanders, J.K.M., 1990. The nature of π-π interactions. J. Am. Chem. Soc. 112, 5525–5534. doi:10.1021/ja00170a016

Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. Nature 354, 56–58.

Iijima, S., Ichihashi, T., 1993. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. Nature 363, 603–605. doi:10.1038/363603a0

INRS, 2016. Nanomatériaux, nanoparticules [WWW Document]. Médecine Mal. Infect. doi:10.1016/S0399-077X(07)80055-2

International Carbon Black Association, 2016a. Carbon black uses - Overview of uses [WWW Document]. URL http://www.carbon-black.org/index.php/carbon-black-uses (consulté le 7.6.17).

International Carbon Black Association, 2016b. Carbon black user’s guide - Safety, health, & environmental information.

Irin, F., Shrestha, B., Canas, J.E., Saed, M.A., Green, M.J., 2012. Detection of carbon nanotubes in biological samples through microwave-induced heating. Carbon N. Y. 50, 4441–4449. doi:10.1016/j.carbon.2012.05.022

IRSST, 2008. Substances chimiques et agents biologiques - Études et recherches - Rapport R-558 - Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules.

Ishii, H., Kataura, H., Shiozawa, H., Yoshioka, H., Otsubo, H., Takayama, Y., Miyahara, T., Suzuki, S., Achiba, Y., Nakatake, M., Narimura, T., Higashiguchi, M., Shimada, K., Namatame, H., Taniguchi, M., 2003. Direct observation of Tomonaga-Luttinger-liquid state in carbon nanotubes at low temperatures. Nature 426, 1–5. doi:10.1038/nature02199.Published

J. Edgington, A., P. Roberts, A., M. Taylor, L., M. Alloy, M., Reppert, J., M. Rao, A., Mao, J., J. Klaine, S., 2010. The influence of natural organic matter on the toxiciy of multiwalled carbon nanotubes. Environ. Toxicol. Chem. 29, 2511–2518. doi:10.1002/etc.309

Jang, J.-W., Cho, S., Moon, G., Ihm, K., Kim, J.Y., Youn, D.H., Lee, S., Lee, Y. hye, Choi, W., Lee, K.-H., Lee, J.S., 2012. Photocatalytic synthesis of pure and water-dispersible graphene monosheets. Chem. - A Eur. J. 18, 2762–2767. doi:10.1002/chem.201103212

Janowska, I., Vigneron, F., Bégin, D., Ersen, O., Bernhardt, P., Romero, T., Ledoux, M.J., Pham-Huu, C., 2012.

Mechanical thinning to make few-layer graphene from pencil lead. Carbon N. Y. 50, 3092–3116. doi:10.1016/j.carbon.2012.02.064

Jarosz, A., Skoda, M., Dudek, I., Szukiewicz, D., 2016. Oxidative stress and mitochondrial activation as the main mechanisms underlying graphene toxicity against human cancer cells. Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. doi:10.1155/2016/5851035

Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., Zhao, Y., Guo, X., 2005. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. Environ. Sci. Technol. 39, 1378–1383. doi:10.1021/es048729l

Jung, S.-K., Qu, X., Aleman-Meza, B., Wang, T., Riepe, C., Liu, Z., Li, Q., Zhong, W., 2015. A multi-endpoint, high-throughput study of nanomaterial toxicity in Caenorhabditis elegans. Environ. Sci. Technol. 49, 2477–2485. doi:10.1021/es5056462

Kang, S., Herzberg, M., Rodrigues, D.F., Elimelech, M., 2008. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! Langmuir 24, 6409–6413. doi:10.1021/la800951v

Kang, S., Pinault, M., Pfefferle, L.D., Elimelech, M., 2007. Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity. Langmuir 23, 8670–8673. doi:10.1021/la701067r

Karajanagi, S.S., Yang, H., Asuri, P., Sellitto, E., Dordick, J.S., Kane, R.S., 2006. Protein-assisted solubilization of single-walled carbon nanotubes. Langmuir 22, 1392–1395. doi:10.1021/la0528201

Karthikeyan, S., Mahalingam, P., Karthik, M., 2009. Large scale synthesis of carbon nanotubes. E-Journal Chem. 6, 1–12. doi:10.1155/2009/756410

Kataura, H., Kumazawa, Y., Maniwa, Y., Ohtsuka, Y., Sen, R., Suzuki, S., Achiba, Y., 2000. Diameter control of single-walled carbon nanotubes. Carbon N. Y. 38, 1691–1697.

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. J. Nanoparticle Res. 15. doi:10.1007/s11051-013-1692-4

Kennedy, A.J., Hull, M., Steevens, J.A., Dontsova, K.M., Chappell, M.A., Gunter, J.C., Weiss, C.A.J., 2008. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1932–1941. doi:10.1897/07-624.1

Khan, U., O'Neill, A., Lotya, M., De, S., Coleman, J.N., 2010. High-concentration solvent exfoliation of graphene. Small 6, 864–871. doi:10.1002/smll.200902066

Kim, K.S., Zhao, Y., Jang, H., Lee, S.Y., Kim, J.M., Kim, K.S., Ahn, J.-H., Kim, P., Choi, J.-Y., Hong, B.H., 2009. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. Nature 457, 706–710. doi:10.1038/nature07719

Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1825–1851. doi:10.1897/08-090.1

Koelmans, A.A., Besseling, E., Shim, W.J., 2015. Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review, in: Bergmann M., Gutow L., Klages M. (eds) Marine Anthropogenic Litter. Cham, p. 325–340. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_12

Koelmans, A.A., Nowack, B., Wiesner, M.R., 2009. Comparison of manufactured and black carbon nanoparticle concentrations in aquatic sediments. Environ. Pollut. 157, 1110–1116. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.006

Kong, X.L., Huang, L.C.L., Hsu, C.M., Chen, W.H., Han, C.C., Chang, H.C., 2005. High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis. Anal. Chem. 77, 259–265. doi:10.1021/ac048971a

Kostarelos, K., Lacerda, L., Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy, S., Pantarotto, D., Briand, J.-P., Muller, S., Prato, M., Bianco, A., 2007. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. Nat. Nanotechnol. 2, 108–113. doi:10.1038/nnano.2006.209

Kostarelos, K., Novoselov, K.S., 2014. Exploring the interface of graphene and biology. Science (80-.). 344, 261–263. doi:10.1126/science.1246736

Kotchey, G.P., Allen, B.L., Vedala, H., Yanamala, N., Kapralov, A.A., Tyurina, Y.Y., Klein-Seetharaman, J., Kagan, V.E., Star, A., 2011. The enzymatic oxidation of graphene oxide. ACS Nano 5, 2098–2108. doi:10.1021/nn103265h

Kotchey, G.P., Zhao, Y., Kagan, V.E., Star, A., 2013. Peroxidase-mediated biodegradation of carbon nanotubes in vitro and in vivo. Adv. Drug Deliv. Rev. 65, 1921–1932. doi:10.1016/j.addr.2013.07.007

Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S., Möller, W., 2013. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. Acc. Chem. Res. 46, 714–722. doi:10.1021/ar300043r

Krueger, A., 2008. Diamond nanoparticles: jewels for chemistry and physics. Adv. Mater. 20, 2445–2449. doi:10.1002/adma.200701856

Kudin, K.N., Ozbas, B., Schniepp, H.C., Prud'homme, R.K., Aksay, I.A., Car, R., 2008. Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets. Nano Lett. 8, 36–41. doi:10.1021/nl071822y

Kuhlbusch, T.A.J., Asbach, C., Fissan, H., Göhler, D., Stintz, M., 2011. Nanoparticle exposure at nanotechnology workplaces: a review. Part. Fibre Toxicol. 8, 1–18. doi:10.1186/1743-8977-8-22

Kumar, A., Ann Lin, P., Xue, A., Hao, B., Khin Yap, Y., Sankaran, R.M., 2013. Formation of nanodiamonds at near-ambient conditions via microplasma dissociation of ethanol vapour. Nat. Commun. 4. doi:10.1038/ncomms3618

Kümmerer, K., Menz, J., Schubert, T., Thielemans, W., 2011. Chemosphere biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. Chemosphere 82, 1387–1392. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.069

Lagier, L., Mouchet, F., Laplanche, C., Mottier, A., Cadarsi, S., Evariste, L., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2017. Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians. Carbon N. Y. 119, 72–81. doi:10.1016/j.carbon.2017.04.016

Lam, C., James, J.T., Mccluskey, R., Arepalli, S., Hunter, R.L., 2006. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. Crit. Rev. Toxicol. 36, 189–217. doi:10.1080/10408440600570233

Lee, C., Wei, X., Kysar, J.W., Hone, J., 2008. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. Science (80-.). 321, 385–388. doi:10.1126/science.1157996

Leite-silva, V.R., Le Lamer, M., Sanchez, W.Y., Liu, D.C., Sanchez, W.H., Morrow, I., Martin, D., Silva, H.D.T., Prow, T.W., Grice, J.E., Roberts, M.S., 2013. The effect of formulation on the penetration of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin in vivo. Eur. J. Pharm. Biopharm. 84, 297–308. doi:10.1016/j.ejpb.2013.01.020

Lévêque, C., 1996. Ecosystèmes aquatiques. Paris, France.

Li, B., Zhang, X.-Y., Yang, J.-Z., Zhang, Y.-J., Li, W.-X., Fan, C.-H., Huang, Q., 2014. Influence of polyethylene glycol coating on biodistribution and toxicity of nanoscale graphene oxide in mice after intravenous injection. Int. J. Nanomedicine 9, 4697–4707. doi:10.2147/IJN.S66591

Li, D., Müller, M.B., Gilje, S., Kaner, R.B., Wallace, G.G., 2008. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. Nat. Nanotechnol. 3, 101–105. doi:10.1038/nnano.2007.451

Li, J., Zhang, S., Chen, C., Zhao, G., Yang, X., Li, J., Wang, X., 2012. Removal of Cu(II) and fulvic acid by graphene oxide nanosheets decorated with Fe3O4 nanoparticles. ACS Appl. Mater. Interfaces 4, 4991–5000. doi:10.1021/am301358b

Li, R., Wang, X., Ji, Z., Sun, B., Zhang, H., Chang, C.H., Lin, S., Meng, H., Liao, Y.-P., Meiying, W., Li, Z., Hwang, A.A., Song, T.-B., Xu, R., Yang, Y., Zink, J.I., Nel, A.E., Xia, T., 2013. Surface charge and cellular processing of covalently functionalized multiwall carbon nanotubes determine pulmonary toxicity. ACS

Nano 7, 2352–2368. doi:10.1021/nn305567s

Li, X., Cai, W., An, J., Kim, S., Nah, J., Yang, D., Piner, R., Velamakanni, A., Jung, I., Tutuc, E., Banerjee, S.K., Colombo, L., Ruoff, R.S., 2009. Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils. Science (80-.). 324, 1312–1314. doi:10.1126/science.1171245

Li, Y., Liu, Y., Fu, Y., Wei, T., Le Guyader, L., Gao, G., Liu, R.-S., Chang, Y.-Z., Chen, C., 2012. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. Biomaterials 33, 402–411. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.091

Li, Z., Chen, F., Yuan, L., Liu, Y., Zhao, Y., Chai, Z., Shi, W., 2012. Uranium(VI) adsorption on graphene oxide nanosheets from aqueous solutions. Chem. Eng. J. 210, 539–546. doi:10.1016/j.cej.2012.09.030

Li, Z., Geng, Y., Zhang, X., Qi, W., Fan, Q., Li, Y., Jiao, Z., Wang, J., Tang, Y., Duan, X., Wu, W., 2011. Biodistribution of co-exposure to multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide nanoplatelets radiotracers. J. Nanoparticle Res. 13, 2939–2947. doi:10.1007/s11051-010-0185-y

Liang, L.J., Wu, T., Kang, Y., Wang, Q., 2013. Dispersion of graphene sheets in aqueous solution by oligodeoxynucleotides. ChemPhysChem 14, 1626–1632. doi:10.1002/cphc.201201084

Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y., Watari, F., 2009. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. J. Hazard. Mater. 170, 578–583. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.05.025

Lin, D., Xing, B., 2008. Tannic acid adsorption and its role for stabilizing carbon nanotube suspensions. Environ. Sci. Technol. 42, 5917–5923. doi:10.1021/es800329c

Lin, X., Li, J., Ma, S., Liu, G., Yang, K., Tong, M., Lin, D., 2014. Toxicity of TiO2 nanoparticles to Escherichia coli: effects of particle size, crystal phase and water chemistry. PLoS One 9, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0110247

Ling, W.L., Biro, A., Bally, I., Tacnet, P., Deniaud, A., Doris, E., Frachet, P., Schoehn, G., Pebay-Peyroula, E., Arlaud, G.J., 2011. Proteins of the innate immune system crystallize on carbon nanotubes but are not activated. ACS Nano 5, 730–737. doi:10.1021/nn102400w

Liu, L.-H., Lerner, M.M., Yan, M., 2010. Derivitization of pristine graphene with well-defined chemical functionalities. Nano Lett. 10, 3754–3756. doi:10.1021/nl1024744

Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J., Fang, X., 2009. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. Nano Lett. 9, 1007–1010. doi:10.1021/nl803083u

Liu, W., Dang, T., Xiao, Z., Li, X., Zhu, C., Wang, X., 2011. Carbon nanosheets with catalyst-induced wrinkles formed by plasma-enhanced chemical-vapor deposition. Carbon N. Y. 49, 884–889. doi:10.1016/j.carbon.2010.10.049

Liu, X., Vinson, D., Abt, D., Hurt, R.H., Rand, D.M., 2009. Differential toxicity of carbon nanomaterials in Drosophila: larval dietary uptake is benign, but adult exposure causes locomotor impairment and mortality. 2009 43, 6357–6363. doi:10.1021/es901079z

Liu, X.T., Mu, X.Y., Wu, X.L., Meng, L.X., Guan, W.B., Ma, Y.Q., Sun, H., Wang, C.J., Li, X.F., 2014. Toxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and reduced graphene oxide to zebrafish embryos. Biomed. Environ. Sci. 27, 676–683. doi:10.3967/bes2014.103

Liu, Y., Liang, P., Zhang, H.-Y., Guo, D.-S., 2006. Cation-controlled aqueous dispersions of alginic-acid-wrapped multi-walled carbon nanotubes. Small 2, 874–878. doi:10.1002/smll.200600099

Liu, Y., Luo, Y., Wu, J., Wang, Y., Yang, X., Yang, R., Wang, B., Yang, J., Zhang, N., 2013. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis. Sci. Rep. 3, 1–8. doi:10.1038/srep03469

Lomeda, J.R., Doyle, C.D., Kosynkin, D. V., Hwang, W.-F., Tour, J.M., 2008. Diazonium functionalization of surfactant-wrapped chemically converted graphene sheets. J. Am. Chem. Soc. 130, 16201–16206. doi:10.1021/ja806499w

Long, Z., Ji, J., Yang, K., Lin, D., Wu, F., 2012. Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes' toxicity toward algae. Environ. Sci. Technol. 46, 8458‑8466. doi:10.1021/es301802g

Lotya, M., King, P.J., Khan, U., De, S., Coleman, J.N., 2010. High-concentration, surfactant-stabilized graphene dispersions. ACS Nano 4, 3155‑3162. doi:10.1021/nn1005304

Luo, J., Cote, L.J., Tung, V.C., Tan, A.T.L., Goins, P.E., Wu, J., Huang, J., 2010. Graphene oxide nanocolloids. J. Am. Chem. Soc. 132, 17667‑17669. doi:10.1021/ja1078943

Luther, G.W., Rickard, D.T., 2005. Metal sulfide cluster complexes and their biogeochemical importance in the environment. J. Nanoparticle Res. 7, 389‑407. doi:10.1007/s11051-005-4272-4

Lyons, P.E., De, S., Blighe, F., Nicolosi, V., Pereira, L.F.C., Ferreira, M.S., Coleman, J.N., 2008. The relationship between network morphology and conductivity in nanotube films. J. Appl. Phys. 104. doi:10.1063/1.2968437

Ma, J., Liu, R., Wang, X., Liu, Q., Chen, Y., Valle, R.P., Zuo, Y.Y., Xia, T., Liu, S., 2015. Crucial role of lateral size for graphene oxide in activating macrophages and stimulating pro-inflammatory responses in cells and animals. ACS Nano 9, 10498‑10515. doi:10.1021/acsnano.5b04751

Magdolenova, Z., Richard Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., Dusinska, M., 2014. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. Nanotoxicology 8, 233‑278. doi:10.3109/17435390.2013.773464

Marcano, D.C., Kosynkin, D. V., Berlin, J.M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Alemany, L.B., Lu, W., Tour, J.M., 2010. Improved synthesis of graphene oxide. ACS Nano 4, 4806‑4814. doi:10.1021/nn1006368

MarketsAndMarkets, 2017. Carbon black market by type (furnace black, channel black, thermal black, acetylene black), application (tire, non-tire rubber, inks & coating, plastic), grade (standard grade, specialty grade), and region - Global forecast to 2021 [WWW Document]. URL http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/carbon-black-market-260675017.html?gclid=EAIaIQobChMIsPLryrH11AIV6rXtCh29vQ9kEAAYASAAEgJKKfD_BwE (consulté le 7.6.17).

MarketsAndMarkets, 2015a. Carbon nanotubes market by type (single walled -and multi-walled), by application (electronics & semiconductors, chemical & polymers, batteries & capacitors, energy, medical application, advanced materials, aerospace & defense, others) - Global forecasts [WWW Document]. URL http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/carbon-nanotubes-139.html (consulté le 7.6.17).

MarketsAndMarkets, 2015b. Graphene market by type (graphene oxide (GO), graphene nanoplatelets (GNP), and others), by application (electronics, composites, energy, coatings, sensors, catalyst and others), by region - Global trends and forecasts to 2020 [WWW Document]. URL http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/graphene-market-83933068.html?gclid=CNHtsNOF9dQCFUHjGwodU_4Ctg

Matesanz, M.-C., Vila, M., Feito, M.-J., Linares, J., Gonçalves, G., Vallet-Regi, M., Marques, P.-A.A.P., Portolés, M.-T., 2013. The effects of graphene oxide nanosheets localized on F-actin filaments on cell-cycle alterations. Biomaterials 34, 1562‑1569. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.11.001

Matsuura, K., Saito, T., Okazaki, T., Ohshima, S., Yumura, M., Iijima, S., 2006. Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions. Chem. Phys. Lett. 429, 497‑502. doi:10.1016/j.cplett.2006.08.044

Maynard, A.D., 2006. Safe handling of nanotechnology. Nature 444, 267‑269. doi:10.1038/444267a

McWilliams, A., 2016. The maturing nanotechnology market: products and applications [WWW Document]. URL https://www.bccresearch.com (consulté le 6.27.17).

Mendonça, M.C.P., Soares, E.S., de Jesus, M.B., Ceragioli, H.J., Ferreira, M.S., Catharino, R.R., da Cruz-Höfling, M.A., 2015. Reduced graphene oxide induces transient blood–brain barrier opening: an in vivo study. J. Nanobiotechnology 13. doi:10.1186/s12951-015-0143-z

Mesaric, T., Sepcic, K., Piazza, V., Gambardella, C., Garaventa, F., Drobne, D., Faimali, M., 2013. Effects of nano

carbon black and single-layer graphene oxide on settlement, survival and swimming behaviour of Amphibalanus amphitrite larvae. Chem. Ecol. 29, 643–652. doi:10.1080/02757540.2013.817563

Ministère de l’Ecologie du Développement durable et de l’Energie, 2016. Eléments issus des déclarations des substances à létat nanoparticulaire - Rapport d’étude 2016.

Ministère de l’Ecologie du Développement durable et de l’Energie, 2013. Elements issus des déclarations des substances à l’état nanopariculaire - Rapport d’étude.

Mochalin, V.N., Shenderova, O., Ho, D., Gogotsi, Y., 2012. The properties and applications of nanodiamonds. Nat. Nanotechnol. 7, 11–23. doi:10.1038/nnano.2011.209

Mohamed, B.M., Verma, N.K., Davies, A.M., McGowan, A., Crosbie-Staunton, K., Prina-Mello, A., Kelleher, D., Botting, C.H., Causey, C.P., Thomson, P.R., Pruijn, G.J., Kisin, E.R., Tkach, A. V., Shvedova, A.A., Volkov, Y., 2012. Citrullination of proteins: a common post-translational modification pathway induced by different nanoparticles in vitro and in vivo. Nanomedicine 7, 1181–1195. doi:10.2217/nnm.11.177

Mohan, N., Chen, C., Hsieh, H., Wu, Y., Chang, H., 2010. In Vivo Imaging and Toxicity Assessments of Fluorescent Nanodiamonds in Caenorhabditis elegans. Nano Lett. 10, 3692–3699. doi:10.1021/nl1021909

Monopoli, M.P., Åberg, C., Salvati, A., Dawson, K.A., 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. Nat. Nanotechnol. 7, 779–786. doi:10.1038/nnano.2012.207

Mottier, A., Mouchet, F., Pinelli, E., Gauthier, L., Flahaut, E., 2017. Environmental impact of engineered carbon nanoparticles: from releases to effects on the aquatic biota. Curr. Opin. Biotechnol. 46, 1–6. doi:10.1016/j.copbio.2016.11.024

Mouchet, F., Landois, P., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., 2007. Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian Ambystoma mexicanum. Nanotoxicology 1, 149–156. doi:10.1080/17435390701556080

Mouchet, F., Landois, P., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2010. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 5, 963–974. doi:10.2217/nnm.10.60

Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2008. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis. Aquat. Toxicol. 87, 127–137. doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.011

Mu, Q., Jiang, G., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B., 2014. Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. Chem. Rev. 114, 7740–7781. doi:10.1021/cr400295a

Murr, L.E., Soto, K.F., Esquivel, E. V., Bang, J.J., Guerrero, P.A., Lopez, D.A., Ramirez, D.A., 2004. Carbon nanotubes and other fullerene-related nanocrystals in the environment: a TEM study. JOM 56, 28–31. doi:10.1007/s11837-004-0106-6

Muzi, L., Mouchet, F., Cadarsi, S., Janowska, I., Russier, J., Ménard-Moyon, C., Risuleo, G., Soula, B., Galibert, A.-M., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., Bianco, A., 2016. Examining the impact of multi-layer graphene using cellular and amphibian models. 2D Mater. 3, 1–10. doi:10.1088/2053-1583/3/2/025009

Mwangi, J.N., Wang, N., Ingersoll, C.G., Hardesty, D.K., Brunson, E.L., Li, H., Deng, B., 2012. Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. Environ. Toxicol. 31, 1–8. doi:10.1002/etc.1888

Mytych, J., Maciej, W., 2013. Nanoparticle technology as a double-edged sword: cytotoxic, genotoxic and epigenetic effects on living cells. J. Biomater. Nanobiotechnol. 4, 53–63. doi:10.4236/jbnb.2013.41008

Nair, R.R., Blake, P., Grigorenko, A.N., Novoselov, K.S., Booth, T.J., Stauber, T., Peres, N.M.R., Geim, A.K., 2008. Fine structure constant defines visual transparency of graphene. Science (80-.). 320. doi:10.1126/science.1156965

Nanowerk, 2017. Carbon nanotubes 101 – Purification methods [WWW Document]. URL

http://www.nanowerk.com/nanotechnology/introduction/introduction_to_nanotechnol%0Aogy_24.php#ixzz39QCtuluD (consulté le 8.12.17).

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17, 372–386. doi:10.1007/s10646-008-0214-0

Nel, A., Wia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science (80-.). 311, 622–627. doi:10.1126/science.1114397

Nepal, D., Geckeler, K.E., 2006. pH-sensitive dispersion and debundling of single-walled carbon nanotubes: lysozyme as a tool. Small 2, 406–412. doi:10.1002/smll.200500351

Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., Firsov, A.A., 2004. Electric field effect in atomically thin carbon films. Science (80-.). 306, 666–669.

Novoselov, K.S., Jiang, D., Schedin, F., Booth, T.J., Khotkevich, V. V., Morozov, S. V., Geim, A.K., 2005. Two-dimensional atomic crystals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 10451–10453. doi:10.1073/pnas.0502848102

Nunes, A., Bussy, C., Gherardini, L., Meneghetti, M., Herrero, M.A., Bianco, A., Prato, M., Pizzorusso, T., Al-Jamal, K.T., Kostarelos, K., 2012. In vivo degradation of functionalized carbon nanotubes after stereotactic administration in the brain cortex. Nanomedicine 7, 1485–1494. doi:10.2217/NNM.12.33

OCDE, 2010a. List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the sponsorship programme for the testing of manufactured nanomaterials: revision. Seris on the safety of manufactured nanomaterials No. 27.

OCDE, 2010b. Guidance manual for the testing of manufactured nanomaterials: OECD's sponsorhip programme; first revision - Series on the safety of manufatured nanomaterials No. 25.

Osswald, S., Yushin, G., Mochalin, V., Kucheyev, S.O., Gogotsi, Y., 2006. Control of sp2/sp3 carbon ratio and surface chemistry of nanodiamond powders by selective oxidation in air. J. Am. Chem. Soc. 128, 11635–11642. doi:10.1021/ja063303n

Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., Sun, T., Shao, L., 2016. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. Part. Fibre Toxicol. 13, 1–24. doi:10.1186/s12989-016-0168-y

Ozawa, M., Inaguma, M., Takahashi, M., Kataoka, F., Krüger, A., Osawa, E., 2007. Preparation and behavior of brownish, clear nanodiamond colloids. Adv. Mater. 19, 1201–1206. doi:10.1002/adma.200601452

Palomäki, J., Välimäki, E., Sund, J., Vippola, M., Clausen, P.A., Jensen, K.A., Savolainen, K., Matikainen, S., Alenius, H., 2011. Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. ACS Nano 5, 6861–6870. doi:10.1021/nn200595c

Panatarani, C., Muthahhari, N., Rianto, A., Joni, I.M., 2016. Purification and preparation of graphite oxide from natural graphite. AIP Conf. Proc. 1719. doi:10.1063/1.4943717

Pantarotto, D., Briand, J.-P., Prato, M., Bianco, A., 2004. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. Chem. Commun. R. Soc. Chem. 16–17. doi:10.1039/b311254c

Paredes, J.I., Villar-Rodil, S., Martinez-Alonso, A., Tascon, J.M.D., 2008. Graphene oxide dispersions in organic solvents graphene oxide dispersions in organic solvents. Langmuir 24, 10560–10564. doi:10.1021/la801744a

Park, E.-J., Lee, G.-H., Han, B.S., Lee, B.-S., Lee, S., Cho, M.-H., Kim, J.-H., Kim, D.-W., 2015. Toxic response of graphene nanoplatelets in vivo and in vitro. Arch. Toxicol. 89, 1557–1568. doi:10.1007/s00204-014-1303-x

Park, E.-J., Lee, S.J., Lee, K., Choi, Y.C., Lee, B.-S., Lee, G.-H., Kim, D.-W., 2017. Pulmonary persistence of graphene nanoplatelets may disturb physiological and immunological homeostasis. J. Appl. Toxicol. 37,

296–309. doi:10.1002/jat.3361

Park, S., An, J., Piner, R.D., Jung, I., Yang, D., Velamakanni, A., Nguyen, S.T., Ruoff, R.S., 2008. Aqueous suspension and characterization of chemically modified graphene sheets. Chem. Mater. 20, 6592–6594. doi:10.1021/cm801932u

Partoens, B., Peeters, F.M., 2006. From graphene to graphite: electronic structure around the K point. Phys. Rev. B 74, 1–11. doi:10.1103/PhysRevB.74.075404

Parviz, D., Das, S., Ahmed, H.S.T., Irin, F., Bhattacharia, S., Green, M.J., 2012. Dispersions of non-covalently functionalized graphene with minimal stabilizer. ACS Nano 6, 8857–8867. doi:10.1021/nn302784m

Pelaz, B., Charron, G., Pfeiffer, C., Zhao, Y., de la Fuente, J.M., Liang, X.-J., Parak, W.J., del Pino, P., 2013. Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions. Small 9, 1573–1584. doi:10.1002/smll.201201229

Pentecost, A., Gour, S., Mochalin, V., Knoke, I., Gogotsi, Y., 2010. Deaggregation of nanodiamond powders using salt- and sugar-assisted milling. ACS Appl. Mater. Interfaces 2, 3289–3294. doi:10.1021/am100720n

Petersen, E.J., Flores-Cervantes, D.X., Bucheli, T.D., Elliott, L., Fagan, J.A., Gogos, A., Hanna, S.K., Kaegi, R., Mansfield, E., Bustos, A.R.M., Plata, D.L., Reipa, V., Westerhoff, P.K., Winchester, M.R., 2016. Quantification of carbon nanotubes in environmental matrices: current capabilities, case studies, and future prospects. Environ. Sci. Technol. 3, 4587–4605. doi:10.1021/acs.est.5b05647

Petersen, E.J., Zhang, L., Mattison, N.T., O'Carroll, D.M., Whelton, A.J., Uddin, N., Nguyen, T., Huang, Q., Henry, T.B., Holbrook, R.D., Chen, K.L., 2011. Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes. Environ. Sci. Technol. 45, 9837–9856. doi:10.1021/es201579y

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. J. Nanoparticle Res. 14. doi:10.1007/s11051-012-1109-9

Poisson, R., 2015. Un point sur le noir de carbone. Actual. Chim. 395, 63–64.

Pradal, J., Maudens, P., Gabay, C., Seemayer, C.A., Jordan, O., Allémann, E., 2016. Effect of particle size on the biodistribution of nano- and microparticles following intra-articular injection in mice. Int. J. Pharm. 498, 119–129. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.12.015

Pretti, C., Oliva, M., Di, R., Monni, G., Cevasco, G., Chiellini, F., Pomelli, C., Chiappe, C., Pietro, R. Di, 2014. Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. Ecotoxicol. Environ. Saf. 101, 138–145. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.11.008

Qu, G., Liu, S., Zhang, S., Wang, L., Wang, X., Sun, B., Yin, N., Gao, X., Xia, T., Chen, J.-J., Jiang, G.-B., 2013. Graphene oxide induces toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent necrosis in macrophages. ACS Nano 7, 5732–5745. doi:10.1021/nn402330b

Quik, J.T.K., Velzeboer, I., Wouterse, M., Koelmans, A.A., van de Meent, D., 2013. Heteroaggregation and sedimentation rates for nanomaterials in natural waters. Water Res. 48, 269–279. doi:10.1016/j.watres.2013.09.036

Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie - Fondements et applications, TEC & DOC. ed. 11, rue Lavoisier F-75008 Paris.

Rauch, J., Kolch, W., Laurent, S., Mahmoudi, M., 2013. Big signals from small particles: regulation of cell signaling pathways by nanoparticles. Chem. Rev. 113, 3391–3406. doi:10.1021/cr3002627

Ray, P.C., Yu, H., Fu, P.P., 2009. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs. J. Environ. Sci. Heal. part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 27, 1–35. doi:10.1080/10590500802708267

Reina, A., Jia, X., Ho, J., Nezich, D., Son, H., Bulovic, V., Dresselhaus, M.S., Kong, J., 2009. Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition. Nano Lett. 9, 30–35.

doi:10.1021/nl801827v

Ren, X., Li, J., Tan, X., Wang, X., 2013. Comparative study of graphene oxide, activated carbon and carbon nanotubes as adsorbents for copper decontamination. Dalt. Trans. 42, 5266‑5274. doi:10.1039/c3dt32969k

Royal Society of Chemistry, 2017. Ultrasonication [WWW Document]. URL http://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0001708 (consulté le 7.25.17).

Ruiz, O.N., Fernando, K.A.S., Wang, B., Brown, N.A., Luo, P.G., McNamara, N.D., Vangsness, M., Sun, Y.-P., Bunker, C.E., 2011. Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth. ACS Nano 5, 8100‑8107. doi:10.1021/nn202699t

Russier, J., Ménard-Moyon, C., Venturelli, E., Gravel, E., Marcolongo, G., Meneghetti, M., Doris, E., Bianco, A., 2011. Oxidative biodegradation of single- and multi-walled carbon nanotubes. Nanoscale 3, 893‑896. doi:10.1039/c0nr00779j

Sanchez, V.C., Jachak, A., Hurt, R.H., Kane, A.B., 2012. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. Chem. Res. Toxicol. 25, 15‑34. doi:10.1021/tx200339h

Sasidharan, A., Panchakarla, L.S., Chandran, P., Menon, D., Nair, S., Rao, C.N.R., Koyakutty, M., 2011. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. Nanoscale 3, 2461. doi:10.1039/c1nr10172b

Sasidharan, A., Panchakarla, L.S., Sadanandan, A.R., Ashokan, A., Chandran, P., Girish, C.M., Menon, D., Nair, S. V., Rao, C.N.R., Koyakutty, M., 2012. Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. Small 8, 1251‑1263. doi:10.1002/smll.201102393

Sato, Y., Yokoyama, A., Nodasaka, Y., Kohgo, T., Motomiya, K., Matsumoto, H., Nakazawa, E., Numata, T., Zhang, M., Yudasaka, M., Hara, H., Araki, R., Tsukamoto, O., Saito, H., Kamino, T., Watari, F., Tohji, K., 2013. Long-term biopersistence of tangled oxidized carbon nanotubes inside and outside macrophages in rat subcutaneous tissue. Sci. Rep. 3, 1‑10. doi:10.1038/srep02516

Sawosz, E., Jaworski, S., Kutwin, M., Hotowy, A., Wierzbicki, M., Grodzik, M., Kurantowicz, N., Strojny, B., Lipińska, L., Chwalibog, A., 2014. Toxicity of pristine graphene in experiments in a chicken embryo model. Int. J. Nanomedicine 9, 3913‑3922. doi:10.2147/IJN.S65633

Scarselli, M., Castrucci, P., De Crescenzi, M., 2012. Electronic and optoelectronic nano-devices based on carbon nanotubes. J. Phys. Condens. Matter 24. doi:10.1088/0953-8984/24/31/313202

SCENIHR, 2007. Opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the technical guidance documents for new and existing susbstances for assessing the risks of nanomaterials.

Schierz, A., Espinasse, B., Wiesner, M.R., Bisesi, J.H., Sabo-Attwood, T., Ferguson, P.L., 2014. Fate of single walled carbon nanotubes in wetland ecosystems. Environ. Sci. Nano 1, 574‑583. doi:10.1039/C4EN00063C

Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., 2011. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? Environ. Sci. Technol. 45, 6136‑6144. doi:10.1021/es200506b

Scott-Fordsmand, J.J., Krogh, P.H., Schaefer, M., Johansen, A., 2008. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to Eisenia veneta earthworms. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 616‑619. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.04.011

See, C.H., Harris, A.T., 2007. A review of carbon nanotube synthesis via fluidized-bed chemical vapor deposition. Ind. Eng. Chem. Res. 46, 997‑1012. doi:10.1021/ie060955b

Seraphin, S., Zhou, D., Jiao, J., Withers, J.C., Loutfy, R., 1993. Effect of processing conditions on the morphology and yield of carbon nanotubes. Carbon N. Y. 31, 685‑689. doi:10.1016/0008-6223(93)90004-T

Shen, C.-X., Zhang, Q.-F., Li, J., Bi, F.-C., Yao, N., 2010. Induction of programmed cell death in Arabidopsis and rice by single-wall carbon nanotubes. Am. J. Bot. 97, 1602‑1609. doi:10.3732/ajb.1000073

Shen, J.-W., Wu, T., Wang, Q., Kang, Y., 2008. Induced stepwise conformational change of human serum albumin on carbon nanotube surfaces. Biomaterials 29, 3847‑3855. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.06.013

Shenderova, O., Koscheev, A., Zaripov, N., Petrov, I., Skryabin, Y., Detkov, P., Turner, S., Van Tendeloo, G., 2011. Surface chemistry and properties of ozone-purified detonation nanodiamonds. J. Phys. Chem. C 115, 9827‑9837. doi:10.1021/jp1102466

Shi, X., Kong, Y., Gao, H., 2008. Coarse grained molecular dynamics and theoretical studies of carbon nanotubes entering cell membrane. Acta Mech. Sin. 24, 161‑169. doi:10.1007/s10409-007-0131-0

Shvedova, A.A., Castranova, V., Kisin, E.R., Schwegler-Berry, D., Murray, A.R., Gandelsman, V.Z., Maynard, A., Baron, P., 2003. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. J. Toxicol. Environ. Heal. Part A 66, 1909‑1926. doi:10.1080/15287390390231566

Shvedova, A.A., Pietroiusti, A., Fadeel, B., Kagan, V.E., 2012. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. Toxicol. Appl. Pharmacol. 261, 121‑133. doi:10.1016/j.taap.2012.03.023

Singh, S.K., Singh, M.K., Nayak, M.K., Kumari, S., Shrivastava, S., Grácio, J.J.A., Dash, D., 2011. Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets. ACS Nano 5, 4987‑4996. doi:10.1021/nn201092p

Sinitskii, A., Dimiev, A., Corley, D.A., Fursina, A.A., Kosynkin, D. V., Tour, J.M., 2010. Kinetics of diazonium functionalization of chemically converted graphene nanoribbons. ACS Nano 4, 1949‑1954. doi:10.1021/nn901899j

Sisto, T.J., Zakharov, L.N., White, B.M., Jasti, R., 2016. Towards pi-extended cycloparaphenylenes as seeds for CNT growth: investigating strain relieving ring-openings and rearrangements. Chem. Sci. 7, 3681‑3688. doi:10.1039/C5SC04218F

Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. Aquat. Toxicol. 82, 94‑109. doi:10.1016/j.aquatox.2007.02.003

Song, H., Hao, L., Tian, Y., Wan, X., Zhang, L., Lv, Y., 2012. Stable and water-dispersible graphene nanosheets: sustainable preparation, functionalization, and high-performance adsorbents for Pb2+. Chempluschem 77, 379‑386. doi:10.1002/cplu.201200012

Sridhar, V., Oh, I.-K., 2010. A coagulation technique for purification of graphene sheets with graphene-reinforced PVA hydrogel as byproduct. J. Colloid Interface Sci. 348, 384‑387. doi:10.1016/j.jcis.2010.04.054

Stankovich, S., Dikin, D.A., Piner, R.D., Kohlhaas, K.A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S.T., Ruoff, R.S., 2007. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. Carbon N. Y. 45, 1558‑1565. doi:10.1016/j.carbon.2007.02.034

Staudenmaier, L., 1898. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure. Eur. J. Inorg. Chem. 31, 1481‑1487. doi:10.1002/cber.18980310237

Strom, T.A., Dillon, E.P., Hamilton, C.E., Barron, A.R., 2010. Nitrene addition to exfoliated graphene: a one-step route to highly functionalized graphene. Chem. Commun. R. Soc. Chem. 49, 4097‑4099. doi:10.1039/c001488e

Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. Environ. Pollut. 185, 69‑76. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.004

Tan, X.-M., Lin, C., Fugetsu, B., 2009. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. Carbon N. Y. 47, 3479‑3487. doi:10.1016/j.carbon.2009.08.018

Taylor, N.S., Merrifield, R., Williams, T.D., Chipman, J.K., Jamie, L.R., Viant, M.R., 2016. Molecular toxicity of cerium oxide nanoparticles to the freshwater alga Chlamydomonas reinhardtii is associated with supra-environmental exposure concentrations. Nanotoxicology 10, 32‑41. doi:10.3109/17435390.2014.1002868

Tegos, G.P., Demidova, T.N., Arcila-Lopez, D., Lee, H., Wharton, T., Gali, H., Hamblin, M.R., 2005. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. Chem. Biol. 12, 1127–1135. doi:10.1016/j.chembiol.2005.08.014

Tian, F., Cui, D., Schwarz, H., Estrada, G.G., Kobayashi, H., 2006. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. Toxicol. Vitr. 20, 1202–1212. doi:10.1016/j.tiv.2006.03.008

Tölle, F.J., Gamp, K., Mülhaupt, R., 2014. Scale-up and purification of graphite oxide as intermediate for functionalized graphene. Carbon N. Y. 75, 432–442. doi:10.1016/j.carbon.2014.04.022

Tung, V.C., Allen, M.J., Yang, Y., Kaner, R.B., 2009. High-throughput solution processing of large-scale graphene. Nat. Nanotechnol. 4, 25–29. doi:10.1038/NNANO.2008.329

Upadhyayula, V.K.K., Gadhamshetty, V., 2010. Appreciating the role of carbon nanotube composites in preventing biofouling and promoting biofilms on material surfaces in environmental engineering: A review. Biotechnol. Adv. 28, 802–816. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.06.006

US EPA, 2008. TSCA Inventory Status of Nanoscale Substances – General Approach.

Vadukumpully, S., Gupta, J., Zhang, Y., Xu, G.Q., Valiyaveettil, S., 2011. Nanoscale functionalization of surfactant wrapped graphene nanosheets with alkylazides for enhanced dispersibility. Nanoscale 3, 303–308. doi:10.1039/c0nr00547a

van Leeuwen, C.J., Vermeire, T.G., 2007. Risk assessment of chemicals: an introduction - Second edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Verneuil, L., 2015. Toxicité environnementale et écotoxicité de nanotubes de carbone chez des diatomées benthiques : de la cellule au biofilm. Université Paul Sabatier France, PhD thesis.

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.-C., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea: ‘‘A sticky story’’. Nanotoxicology 9, 219–229. doi:10.3109/17435390.2014.918202

Von Der Kammer, F., Ferguson, P.L., Holden, P.A., Masion, A., Rogers, K.R., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Unrine, J.M., 2012. Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): general considerations and conceptual case studies. Environ. Toxicol. Chem. 31, 32–49. doi:10.1002/etc.723

Waissi-Leinonen, G.C., Nybom, I., Pakarinen, K., Akkanen, J., Leppänen, M.T., Kukkonen, J.V.K., 2015. Fullerenes (nC60) affect the growth and development of the sediment-dwelling invertebrate Chironomus riparius larvae. Environ. Pollut. 206, 17–23. doi:10.1016/j.envpol.2015.06.010

Wang, S., Lu, W., Tovmachenko, O., Rai, U.S., Yu, H., Ray, P.C., 2008. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. Chem. Phys. Lett. 463, 145–149. doi:10.1016/j.cplett.2008.08.039

Wang, X., Zhi, L., Müllen, K., 2008. Transparent, conductive graphene electrodes for dye-sensitized solar cells. Nano Lett. 8, 323–327. doi:10.1021/nl072838r

Wen, K.-P., Chen, Y.-C., Chuang, C.-H., Chang, H.-Y., Lee, C.-Y., Tai, N.-H., 2015. Accumulation and toxicity of intravenously-injected functionalized graphene oxide in mice. J. Appl. Toxicol. 35, 1211–1218. doi:10.1002/jat.3187

Werner, M., Markanovic, M., Ciesla, C., Brand, L., 2014. Economic analysis of market opportunities for CNTs and nanodiamond, in: Fecht, H.-J., Brühne, K., Gluche, P. (Éd.), Carbon-based nanomaterials and hybrids. Pan Stanford Publishing, p. 171–199. doi:10.1201/b15673-9

Wiesner, M.R., Lowry, G. V., Alvarez, P., Dionysiou, D., Biswas, P., 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. Environ. Sci. Technol. 40, 4336–4345. doi:10.1021/es062726m

Wiesner, M.R., Lowry, G. V., Jones, K.L., Hochella JR., M.F., Di Giulio, R.T., Casman, E., Bernhardt, E.S., 2009. Decreasing uncertainties in assessing environmental exposure, risk, and ecological implications of

nanomaterials. Environ. Sci. Technol. 43, 6453–6457. doi:10.1021/es803621k

Wijnhoven, S.W.P., Peijnenburg, W.J.G.M., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H.W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van de Meent, D., Dekkers, S., De Jong, W.H., Van Zijverden, M., Sips, A.J.A.M., Geertsma, R.E., 2009. Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicology 3, 109–138. doi:10.1080/17435390902725914

Williams, O.A., 2011. Nanocrystalline diamond. Diam. Relat. Mater. 20, 621–640. doi:10.1016/j.diamond.2011.02.015

Wilson, M., Kannangara, K., Smith, G., Simmons, M., Raguse, B., 2002. Nanotechnology: basic science and emerging technologies.

Wu, B., Hu, D., Kuang, Y., Liu, B., Zhang, X., Chen, J., 2009. Functionalization of carbon nanotubes by an ionic-liquid polymer: dispersion of Pt and PtRu nanoparticles on carbon nanotubes and their electrocatalytic oxidation of methanol. Angew. Chemie - Int. Ed. 48, 4751–4754. doi:10.1002/anie.200900899

Wu, J., Pisula, W., Müllen, K., 2007. Graphenes as potential material for electronics. Chem. Rev. 107, 718–747. doi:10.1021/cr068010r

Wu, S.-Y., An, S.S.A., Hulme, J., 2015. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. Int. J. Nanomedicine 10, 9–24. doi:10.2147/IJN.S88285

Xu, J., Wang, L., Zhu, Y., 2012. Decontamination of bisphenol A from aqueous solution by graphene adsorption. Langmuir 28, 8418–8425. doi:10.1021/la301476p

Yang, C., Mamouni, J., Tang, Y., Yang, L., 2010. Antimicrobial activity of single-walled carbon nanotubes: length effect. Langmuir Artic. 26, 16013–16019. doi:10.1021/la103110g

Yang, K., Gong, H., Shi, X., Wan, J., Zhang, Y., Liu, Z., 2013. In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration. Biomaterials 34, 2787–2795. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.001

Yang, K., Wan, J., Zhang, S., Zhang, Y., Lee, S.-T., Liu, Z., 2011. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice. ACS Nano 5, 516–522. doi:10.1021/nn1024303

Yang, Z., Yan, H., Yang, H., Li, H., Li, A., Cheng, R., 2013. Flocculation performance and mechanism of graphene oxide for removal of various contaminants from water. Water Res. 47, 3037–3046. doi:10.1016/j.watres.2013.03.027

Yao, Y., Costa, M., 2013. Genetic and epigenetic effects of nanoparticles. J. Mol. Genet. Med. 7. doi:10.4172/1747-0862.1000086

Yoon, K.Y., An, S.J., Chen, Y., Lee, J.H., Bryant, S.L., Ruoff, R.S., Huh, C., Johnston, K.P., 2013. Graphene oxide nanoplatelet dispersions in concentrated NaCl and stabilization of oil/water emulsions. J. Colloid Interface Sci. 403, 1–6. doi:10.1016/j.jcis.2013.03.012

Yue, H., Wei, W., Yue, Z., Wang, B., Luo, N., Gao, Y., Ma, D., Ma, G., Su, Z., 2012. The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. Biomaterials 33, 4013–4021. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.021

Yue, Z.-G., Wei, W., Lv, P.-P., Yue, H., Wang, L.-Y., Su, Z.-G., Ma, G.-H., 2011. Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. Biomacromolecules 12, 2440–2446. doi:10.1021/bm101482

Zhang, L., Petersen, E.J., Habteselassie, M.Y., Mao, L., Huang, Q., 2013. Degradation of multiwall carbon nanotubes by bacteria. Environ. Pollut. 181, 335–339. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.058

Zhang, X., Yin, J., Peng, C., Hu, W., Zhu, Z., Li, W., Fan, C., Huang, Q., 2011. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. Carbon N. Y. 49, 986–995. doi:10.1016/j.carbon.2010.11.005

Zhao, G., Li, J., Ren, X., Chen, C., Wang, X., 2011. Few-layered graphene oxide nanosheets for heavy metal ion pollution management. Environ. Sci. Technol. 45, 10454–10462. doi:dx.doi.org/10.1021/es203439v

Zhao, J., Wang, Z., White, J.C., Xing, B., 2014. Graphene in the aquatic environment: adsorption, dispersion, toxicity and transformation. Environ. Sci. Technol. 48, 9995–10009. doi:10.1021/es5022679

Zhao, X., 2011. Self-assembly of DNA segments on graphene and carbon nanotube arrays in aqueous solution: a molecular simulation study. J. Phys. Chem. C 115, 6181–6189. doi:10.1021/jp110013r

Zhao, Y., Wu, Q., Wang, D., 2016. An epigenetic signal encoded protection mechanism is activated by graphene oxide to inhibit its induced reproductive toxicity in Caenorhabditis elegans. Biomaterials 79, 15–24. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.052

Zhou, H., Zhao, K., Li, W., Yang, N., Liu, Y., Chen, C., Wei, T., 2012. The interactions between pristine graphene and macrophages and the production of cytokines/chemokines via TLR- and NF-κB-related signaling pathways. Biomaterials 33, 6933–6942. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.064

Zhou, R., Gao, H., 2014. Cytotoxicity of graphene: recent advances and future perspective. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology 6, 452–474. doi:10.1002/wnan.1277

Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO2 nanoparticle aggregates in Daphnia magna. Chemosphere 78, 209–215. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.013

Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, S., 2009. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to Daphnia magna. J. Nanoparticle Res. 11, 67–75. doi:10.1007/s11051-008-9426-8

Zuo, G., Zhou, X., Huang, Q., Fang, H., Zhou, R., 2011. Adsorption of villin headpiece onto graphene, carbon nanotube, and C60: effect of contacting surface curvatures on binding affinity. J. Phys. Chem. C 115, 23323–23328. doi:10.1021/jp208967t

CHAPITRE 2



PRÉSENTATION DES MODÈLES BIOLOGIQUES ET DES NANOPARTICULES DE CARBONE

1. Introduction

Pour évaluer la toxicité des nanoparticules de carbone d'intérêt, différents modèles biologiques ont été utilisés. Ce chapitre dresse le portrait des NPC et des organismes biologiques choisis. Par ailleurs, les conditions d'exposition aux NPC et les paramètres biologiques étudiés chez chaque organisme seront décrits ultérieurement dans des chapitres dédiés. Ici, l'ensemble des NPC utilisées lors de ces travaux sont mentionnées et décrites de manière succincte. Certaines caractéristiques propres à ces NPC seront par ailleurs plus amplement détaillées, le cas échéant, dans les chapitres suivants. D'autre part, il est fait état des conditions d'élevage et des cycles de développement de trois organismes (*Chironomus riparius*, *Xenopus laevis*, et *Pleurodeles waltl.*). Le stade développemental utilisé lors des expositions est précisé, stade notamment choisi pour sa sensibilité.

2. Présentation des nanoparticules de carbone

Les organismes utilisés pendant cette thèse -et principalement les xénopes- ont été exposés à différentes types de nanoparticules, regroupant en tout 17 allotropes de carbone. Précisons que certaines expositions (7 sur 17) ont été réalisées antérieurement à cette thèse et ont déjà été décrites dans les travaux de thèse de Périne Landois (Landois, 2008) et de Floriane Bourdiol (Bourdiol, 2013), ainsi que dans les travaux du Laboratoire Commun Nautile (CNRS, INPT, UPS, ARKEMA, France) (Mouchet et Gauthier, 2014). Néanmoins, les résultats de croissance et de génotoxicité chez le xénope issus de ces travaux ont ici été retravaillés différemment ou réutilisés pour être comparés aux nôtres. De ce fait, la deuxième partie de ce chapitre propose de donner quelques éléments de caractérisation pour définir l'ensemble des NPC abordées dans le présent manuscrit. D'autre part, d'autres éléments se rapportant aux propriétés des NPC (qualité de dispersion, nature des fonctions oxygénées présentes à la surface, etc.) seront plus amplement décrits dans les chapitres suivants, en particulier pour les particules qui ont constitué l'essentiel de nos travaux, à savoir les matériaux de la famille du graphène.

Ainsi, des NPC de 0, 1 ou 2 dimensions ont été traitées et sont présentées dans les Tableaux 1 à 3 (leur appartenance à ces travaux de thèse à proprement parler ou à des travaux antérieurs est précisée). La caractérisation des NPC a été effectuée grâce à plusieurs paramètres. En premier lieu, la taille (longueur et/ou diamètre) des particules a été déterminée par observation directe en microscopie électronique à transmission (MET). Brièvement, cette technique de microscopie est basée sur le passage (la transmission) d'un faisceau d'électrons à travers un échantillon très mince. Les électrons traversent l'échantillon différemment suivant sa densité et

sa nature chimique. Les interactions entre les électrons et l'échantillon sont alors analysées pour donner naissance à une image. L'obtention du nombre de parois ou de feuillets a, quant à elle, nécessité l'utilisation de la MET à haute résolution (METHR) dont le principe est similaire, et qui permet une résolution plus fine des images obtenues, comme son nom l'indique. De plus, la surface spécifique des NPC a été mesurée par la méthode de Brunauer-Emmett-Teller (BET), dont le principe repose sur l'adsorption d'une couche monoatomique de gaz -le plus souvent le diazote- à la surface des particules. Le volume monoatomique de diazote adsorbé peut alors être quantifié, et permettre d'obtenir une valeur de surface spécifique externe. Seule la surface spécifique d'une des NPC testées (le graphène multi-feuillet FLG-pencil) a été mesurée par une autre méthode : l'adsorption de bleu de méthylène, qui mesure la surface spécifique totale (externe et interne) des particules par l'adsorption de liquide polaire, comme décrit pour les particules argileuses (Konrad et Gabezas, 2008). La valeur affichée ($m^2.g^{-1}$) est donc surestimée par rapport aux autres.

Les origines des NPC utilisées sont très diverses. Les nanodiamants (ND) mentionnés dans ce manuscrit proviennent du Laboratoire Capteurs Diamant du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA). Le noir de carbone (CB, en anglais « carbon black ») est issu du commerce (Evonik, lamp black 101). Ces nanoparticules à 0 dimension sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules de carbone à 0 dimension utilisées dans cette thèse. ND : nanodiamants ; CB : noir de carbone (« carbon black » en anglais, dit de type « Lamp black ») ; nd : non disponible ; MET : Microscopie électronique à transmission ; BET : méthode de Brunauer-Emmett-Teller ; HPHT : haute pression haute température ; wt.% : pourcentage massique. Les ND et le CB n'ont pas été directement utilisés dans cette thèse mais ont fait l'objet de travaux antérieurs (Mouchet et Gauthier, 2014).

	ND	**CB**
Synthèse / production	Broyage de diamants macroscopiques sous HPHT	Combustion incomplète d'hydrocarbures de goudron
Catalyseur	Aucun	Aucun
Contenu en carbone	99,5 wt.%	> 97 %
Contenu en oxygène	< 0,5 wt.%	nd
Diamètre (MET)	15-50 nm	50-200 nm
Surface spécifique (BET)	210 $m^2.g^{-1}$	25 $m^2.g^{-1}$

D'autre part, les NPC à 1 dimension utilisées dans cette thèse (Tableau 2) proviennent également de différentes sources. Les nanotubes de carbone double paroi bruts (appelés DWCNT) ont été synthétisés au CIRIMAT (Bourdiol, 2013). De ce stock initial de DWCNT, une partie a été utilisée telle quelle pour l'exposition des organismes, tandis qu'une autre partie a été mise en présence de matière organique naturelle (décrite ci-après dans cette partie) pour

former les DW-SRNOM. Enfin, une autre partie des DWCNT bruts a été oxydée comme précédemment décrit par Bortolamiol *et al.* (2014) pour produire des DW-ox (produits au CIRIMAT sous la référence R260115). Les nanotubes de carbone muti-paroi bruts (MWCNT) ont été fourni par la société Arkéma, et une partie d'entre eux ont été utilisés après ajout d'un polymère de synthèse (décrit ci-après dans cette partie) : les MW-CMC. D'autres MWCNT (nommées MW2010) ont quant a eux été produits au CIRIMAT (Mouchet et Gauthier, 2014).

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules de carbone à 1 dimension utilisées dans cette thèse. SWCNT : nanotube de carbone mono-paroi (en anglais, « single-walled carbon nanotube ») ; DWCNT : nanotubes de carbone double paroi (en anglais, « double-walled carbon nanotubes ») ; TWCNT : nanotube de carbone triple-paroi (en anglais, « triple-walled carbon nanotube ») ; MWCNT : nanotubes de carbone muti-paroi (en anglais, « multi-walled carbon nanotubes ») ; DW-ox : DWCNT oxydés ; DW-SRNOM : DWCNT en présence de matière organique naturelle ; MW-CMC : MWCNT en présence de carboxyméthylcellulose ; MW2010 : autre lot de MWCNT ; MW-Décano : lot de MWCNT du projet Décano ; MW-TEG-amine : MW-Décano fonctionnalisés avec du triéthylène glycol-amine ; MET : Microscopie électronique à transmission ; METHR : MET haute résolution ; BET : méthode de Brunauer-Emmett-Teller ; nd : non disponible ; wt.% : pourcentage massique. Les NPC directement utilisées dans cette thèse sont soulignées, les autres ont fait l'objet de travaux antérieurs.

	DW-ox	**DWCNT & DW-SRNOM**	**MWCNT & MW-CMC**	**MW2010**	**MW-Décano**	**MW-TEG-amine**
Synthèse / production	Traitement des DWCNT bruts par l'HNO_3 3M à 130°C pendant 24h	Dépôt chimique catalytique en phase vapeur				Oxydation par H_2SO_4/HNO_3 puis fonctionnalisation par amidation des groupes carboxyliques ainsi formés par des ligands de TEG
Catalyseurs	Aucun (mais synthétisés à partir des DWCNT)	Co/Mo-MgO	Fe-Al_2O_3	Co, Mo, Fe, Al	Fe, toluène/ ferrocène	Aucun (mais synthétisés à partir des MW-Décano)
Contenu en carbone	88,3 wt.%	92,0 wt.%	90,0 wt.%	94,6 wt.%	nd	nd
Contenu en oxygène	11,7 wt.%	3,5 wt.%	~ 1 wt.%	nd	nd	nd
Nombre de parois (METHR)	80% DWCNT, 15% SWCNT, 5% TWCNT		5-15 (100% MWCNT)	5-15 (100% MWCNT)	nd	
Taille (MET)	1 à plus de 100 µm (longueur), 1-3 nm (ø)		1-10 µm (longueur), 10-15 nm (ø)	0,1-10 µm (longueur), 12 nm (ø)	1,2 µm (longueur), 20 nm (ø)	
Surface spécifique (BET)	300 $m^2.g^{-1}$	980 $m^2.g^{-1}$	240 $m^2.g^{-1}$	270 $m^2.g^{-1}$	nd	nd

Nous avons aussi utilisé un autre lot de MWCNT bruts, ici nommés MW-Décano, en référence au projet Décano dans le cadre duquel ils ont été fournis, après avoir été synthétisés au Laboratoire Edifices Nanométriques (LEDNA) de Saclay (sous la référence AM S-MWCNT). Une partie des nanotubes bruts a été traitée pour produire des nanotubes fonctionnalisés par greffage d'un composé de TEG-diamine Mono-Boc (Sigma-Aldricht), ici nommés MW-TEG-amine. Le taux de fonctionnalisation en question correspond à 0,45 $mmol.g^{-1}$ de poudre de nanotubes, soit 3,35 $mg.L^{-1}$ de TEG-diamine Mono-Boc pour une concentration de 50 $mg.L^{-1}$ de nanotubes. A cette concentration, l'innocuité de la TEG-diamine (seule) a été vérifiée expérimentalement lors de nos expositions, et le composé n'a entrainé aucun effet chez le xénope. Cette fonctionnalisation covalente a permis d'améliorer la stabilité des nanotubes dans l'eau par rapport à leur équivalent brut, qui sédimente rapidement quant à lui. Dans le même ordre d'idée, l'oxydation des DWCNT en DW-ox a également permis d'augmenter leur stabilité dans les milieux d'exposition.

L'état de dispersion des NPC peut fortement influencer leurs effets sur le vivant (Navarro *et al.*, 2008). Outre la fonctionnalisation covalente des NPC, en conditions environnementales, de nombreux composés naturels (macromolécules organiques par exemple) peuvent interagir avec les NPC et influencer leur état de dispersion. Afin de simuler des conditions de dispersions plus plausibles sur le plan environnemental, certaines des NPC brutes à 1 dimension ont été utilisées en présence d'agents dispersants hydrosolubles. Ces NTC ont alors été dispersés par fonctionnalisation non-covalente. Un éther de cellulose d'origine synthétique, la carboxyméthylcellulose (CMC), a été retenu pour disperser les MWCNT (Figure 1). Il s'agit d'un polymère anionique incolore, fréquemment utilisé dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'additif (E466), mais également pour des applications cosmétiques et pharmaceutiques. La CMC peut également être incorporée dans des préparations de résines, de peintures, de colles ou d'encres d'impression. La CMC ici utilisée ($C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$, Fluka) présente pour caractéristiques une faible viscosité en solution (15-50 mPa.s), une densité de 1,59 $g.cm^{-3}$, un poids moléculaire de 15-50 kDa, et un degré de polymérisation de 60 à 90. Elle n'induirait pas de toxicité chez les organismes aquatiques aux doses testées dans notre étude (Van Ginkel et Gayton, 1996). Son innocuité chez la larve de xénope a d'ailleurs été vérifiée expérimentalement (Bourdiol, 2013).

Figure 1. Structure chimique de la carboxyméthylcellulose. Les groupes $–CH_2COOH$ (en rouge) sont ceux qui la différencient de la cellulose et la rendent hydrophile.

Par ailleurs, un dispersant synthétique tel que la CMC n'est pas présent dans les écosystèmes aquatiques en concentration suffisante pour influencer la dispersion des NPC. Un autre agent dispersant, plus pertinent pour mener des tests de toxicité environnementale, a été utilisé pour disperser les DWCNT : de la matière organique naturelle de la rivière Suwannee (SRNOM). Les acides humiques et fulviques de la matière organique naturelle sont effectivement connus pour disperser efficacement et durablement les NPC (Gigault *et al.*, 2012; Grillo *et al.*, 2015). Dans les milieux aquatiques, cette matière organique est généralement présente à une concentration de l'ordre de 10 $mg.L^{-1}$ (Oeurng *et al.*, 2011) permettant de disperser au moins 1 $mg.L^{-1}$ des DWCNT ici utilisés (Verneuil, 2015). La SRNOM (1R101N, International Humic Substances Society, IHSS) ici utilisée est un mélange naturel complexe de substances humiques de faible teneur en sels. Elle se caractérise par une masse moléculaire de 2600 à 3100 $g.mol^{-1}$ et par une acidité carboxylique comprise entre 9,5 et 11,5 $meq.g^{-1}$ de carbone. Enfin, elle est composée de 52,47 % de carbone, 42,69 % d'oxygène, 4,19 % d'hydrogène, 1,1 % d'azote, 0,65 % de soufre et 0,02 % de phosphore (w/w).

D'autre part, nous avons également travaillé à partir de NPC à 2 dimensions (Tableau 3). Presque tous (sauf le grène multi-feuillets FLG-pencil) ont été produits dans le cadre du projet européen Graphene Flagship. L'oxyde de graphène (GO, en anglais « graphene oxide ») et le graphène multi-feuillets « ball » (FLG-ball, en anglais « few layer graphene synthetized by ball-milling ») ont été fournis par le groupe Antolin *via* l'UCLM (Universidad de Castilla~La Mancha). Les oxydes de graphène réduits à 200 et 1000°C ont été synthétisés au CIRIMAT à partir du GO (lot n°2). Un autre graphène multi-feuillets (FLG-pencil, en anglais « few layer graphene synthetized by pencil lead ») a quant à lui été fourni par l'Institut de Physique et de Chimie des matériaux de Strasbourg (IPCMS) dans le cadre du projet Défi NANOS démarré en 2012 : Graphène, Nouveaux paradigmes, Nanomédecine, Nanométrologie (G3N).

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules de carbone à 2 dimensions utilisées dans cette thèse. FLG-ball : graphène multi-feuillets (en anglais, « few layer graphene » synthétisé par la méthode « ball milling ») ; FLG-pencil : graphène multi-feuillets (en anglais, « few layer graphene » synthétisé par la méthode « pencil lead ») ; GO-1, GO-2, GO-3 : oxyde de graphène (en anglais, « graphene oxide ») appartenant à différents lots fournis par le groupe Antolin (respectivement : nxGOH_027A, nxGOH_028B, nxGOH_37B) ; rGO200, rGO1000 : GO réduit (en anglais, « reduced graphene oxide ») à respectivement 200 et 1000°C sous H_2 ; MET : Microscopie électronique à transmission ; METHR : MET haute résolution ; BET : méthode de Brunauer-Emmett-Teller ; GANF® : Grupo Antolin Carbon Nanofibers ; nd : non disponible ; wt.% : pourcentage massique. Les NPC directement utilisées dans cette thèse sont soulignées, les autres ont fait l'objet de travaux antérieurs.

	FLG-ball	**FLG-pencil**	**GO-1**	**GO-2**	**GO-3**	**rGO200**	**rGO1000**
Synthèse / production	Broyage à billes de graphite	Ablation de mine de crayon	Méthode de Hummer appliquée à des nanofibres GANF®			Traitement thermique du GO-2 sous hydrogène (5 $L.h^{-1}$) à 200°C	Traitement thermique du GO-2 sous hydrogène (5 $L.h^{-1}$) à 1000°C
Catalyseurs	Aucun	Aucun	Ni, Fe, Co, Mn			Aucun (mais synthétisés à partir du GO-2)	
Contenu en carbone	95,0 wt.%	95,0 wt.%	45,2 wt.%	48,1 wt.%	48,0 wt.%	86,7 wt.%	84,4 wt.%
Contenu en oxygène	5,0 wt.%	nd	51,3 wt.%	48,4 wt.%	48,2 wt.%	13,3 wt.%	15,4 wt.%
Nombre de feuillets (METHR)	5-30	5-8	1-5 (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (Anses), 2011)				
Taille (MET)	2,25 µm	2 µm	0,2-8 µm				
Surface spécifique (BET)	10 $m^2.g^{-1}$	400 $m^2.g^{-1}$ (autre méthode*)	228 $m^2.g^{-1}$	253 $m^2.g^{-1}$	206 $m^2.g^{-1}$	16 $m^2.g^{-1}$	175 $m^2.g^{-1}$

*Absorption au bleu de méthylène

3. Présentation des modèles biologiques

Utilisés depuis de nombreuses années au laboratoire Ecolab, trois modèles biologiques se sont avérés pertinents pour l'évaluation des effets des NPC sur le milieu dulçaquicole : le xénope (*Xenopus laevis*), le chironome (*Chironomus riparius*) et le pleurodèle (*Pleurodeles waltl.*). L'utilisation et l'élevage des amphibiens ont été réalisés dans le respect de la règlementation en vigueur sur l'expérimentation animale s'appliquant aux vertébrés. Ainsi, le laboratoire Ecolab (Castanet-Tolosan) a bénéficié d'une autorisation de projet (référencé sous le numéro APAFIS#1329-2015061214552715 v3) concernant l'utilisation des animaux à des fins scientifiques, délivrée par le Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche. De plus, l'établissement (Ecolab, Castanet-Tolosan) a obtenu un agrément (numéro A 31 113 002) en tant qu'utilisateur/éleveur/fournisseur d'animaux utilisés à des fins scientifiques. Par ailleurs, chaque manipulateur a validé une formation d'expérimentation animale délivrée par le CNRS et bénéficie d'un livret de compétence.

3.1. Le diptère *Chironomus riparius*

L'espèce *Chironomus riparius* fait partie des chironomidés, une des plus importantes familles de diptères. Présents dans de très nombreux écosystèmes aquatiques, notamment d'Europe et d'Amérique du Nord, ce sont des organismes ubiquistes. Les chironomidés sont le groupe le plus abondant parmi les insectes dulçaquicoles (Environnement Canada, 1997; Griffiths, 1992). Ainsi, les ruisseaux de petite et moyenne taille peuvent abriter jusqu'à 50 000 individus par mètre carré. Ce sont des consommateurs primaires, les larves broutant la surface des sédiments, et des proies pour les oiseaux, poissons, amphibiens ainsi que divers invertébrés aquatiques. Les chironomes constituent donc un maillon essentiel des réseaux trophiques.

Le cycle de développement de *Chironomus riparius*, qui dure entre 20 et 30 jours à 21°C, est holométabole, comprenant une phase aérienne (représentée par l'adulte), et trois phases aquatiques (de l'œuf à la nymphe, en passant par la larve) (Figure 2).

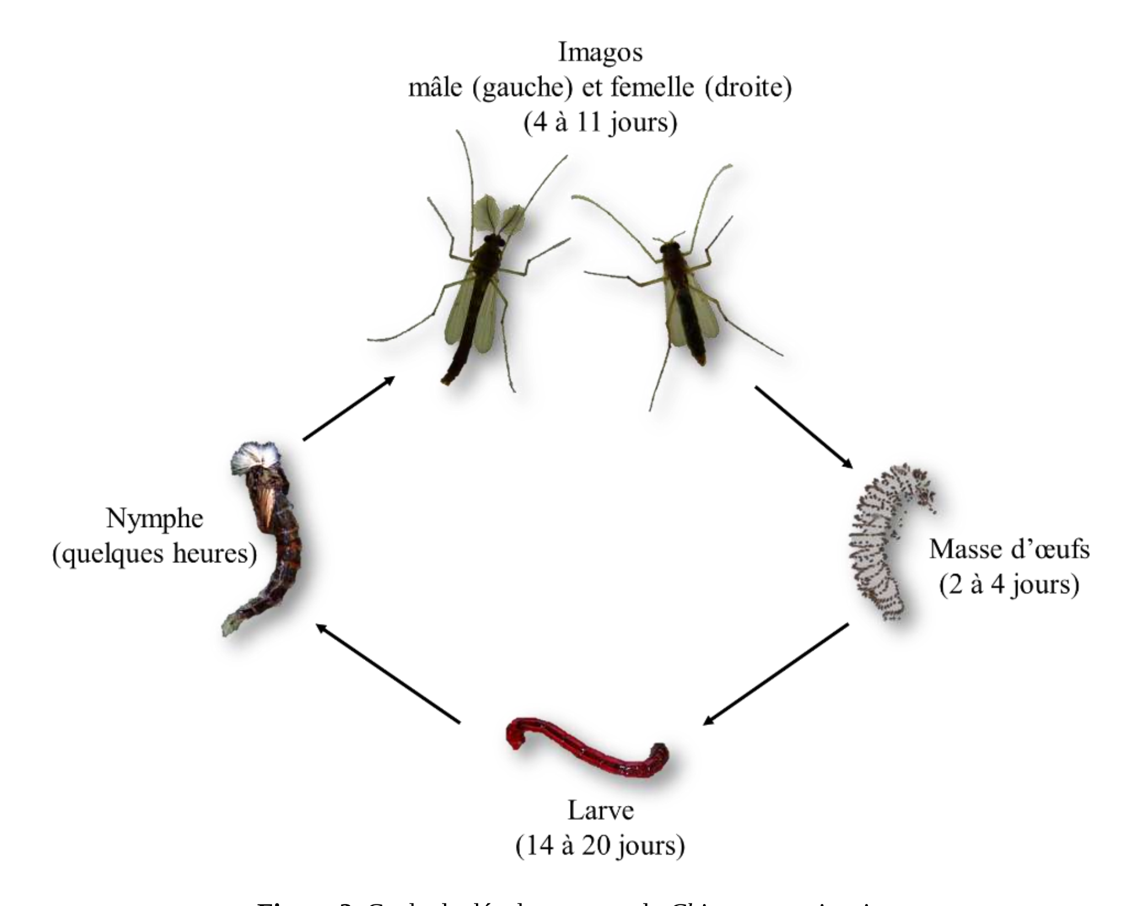


Figure 2. Cycle de développement de *Chironomus riparius*

Concernant les caractéristiques de reproduction, la femelle *C. riparius* pond une série d'œufs enrobés d'un manteau mucilagineux appelé "masses". Ces dernières sont réniformes et sont composées en moyenne de 200 à 400 œufs. La femelle dépose ses œufs sur un support solide à

la surface de l'eau. Après éclosion, les larves consomment le matériel mucilagineux et s'enfouissent dans les sédiments au sein duquel elles vont principalement évoluer. En terme de durée, la larve constitue l'essentiel du cycle de vie d'un chironome (Walshe, 1947). Les larves de *C. riparius* ont un impact non négligeable sur les sédiments du fait de leur activité de bioturbation, conduisant à un remaniement sur les premiers centimètres de profondeur. Ceci implique l'ingestion des particules les plus fines et donc une exposition particulièrement importante aux contaminants présents dans ces sédiments. Les risques de bioaccumulation dans ces conditions ne sont donc pas négligeables (Oberholster *et al.*, 2011). Etant des consommateurs primaires, les larves peuvent ainsi être des vecteurs de contamination de la chaîne trophique. Il s'agit d'organismes filtreurs-brouteurs remontant régulièrement à la surface des sédiments à la recherche de nourriture. Ainsi, les individus sont présents dans le compartiment sédimentaire mais également à sa surface. Les larves évoluent selon quatre stades de développement. Au cours du stade I, allant de 2 à 4 jours, elles sont de couleur crème et difficiles à voir à l'œil nu. La capsule céphalique mesure entre 0,07 et 0,12 mm de large. Lors du stade II (durant 2 à 4 jours également), la larve initie la production d'hémoglobine et devient rose. La capsule céphalique est alors de 0,13 à 0,24 mm. Le stade III (2 à 4 jours) est caractérisé par un changement de couleur typique des larves qui deviennent alors rouge vif. Enfin, durant le stade IV, allant de 5 à 7 jours, les larves ont un corps rouge vif et une tête brun jaunâtre avec des ocelles noirs. La capsule céphalique mesure alors de 0,43 à 0,60 mm de large. Lorsque les organismes ont atteint leur longueur maximale (12 mm pour les mâles et 14 mm pour les femelles), les derniers jours du stade sont consacrés à l'accumulation de réserves énergétiques nécessaires à l'émergence. A la fin de ce stade, la larve mue en nymphe. Les nymphes de *C. riparius* remontent la colonne d'eau pour atteindre la surface où le processus d'émergence a lieu en quelques minutes. Au cours de cette étape, l'individu est très vulnérable et particulièrement exposé aux prédateurs. Cette émergence est bimodale : les mâles, aisément reconnaissables grâce à leurs antennes plumeuses, se développent plus rapidement que les femelles (Oberholster *et al.*, 2011). Durant les quelques jours de leur vie adulte, les imagos cherchent à se reproduire et à se disperser.

Chironomus riparius est un modèle écotoxicologique largement utilisé pour l'étude de sédiments contaminés ainsi que lors d'essais de contamination de la colonne d'eau. Les principaux polluants concernés par ces recherches sont les métaux lourds (Janssens De Bisthoven *et al.*, 1992; Péry *et al.*, 2008), les pesticides (Faria *et al.*, 2007), les radionucléides (Dias *et al.*, 2008) et, plus récemment, les nanoparticules (Nair *et al.*, 2013; Oberholster *et al.*,

2011). Plusieurs bioessais ont, à l'heure actuelle, été normalisés au niveau français (AFNOR, 2004) et international (Environnement Canada, 1997; OECD, 2004a, 2004b). Ils permettent l'étude de divers paramètres tels que la mortalité, la croissance, le développement et la reproduction. Nombre d'autres paramètres sont également analysés même s'ils ne bénéficient pas de tests normalisés. Il s'agit de l'asymétrie fluctuante, la génotoxicité, la tératogénicité, l'activité enzymatique et l'expression génique. Le rôle écologique du chironome *via* sa position au sein des réseaux trophiques et sa capacité à accumuler les polluants en font un organisme de grand intérêt pour l'écotoxicologie. A ceci s'ajoutent la courte durée de son cycle de vie, sa facilité relative d'élevage, et les connaissances que nous possédons sur sa physiologie et ses réponses aux contaminants.

L'élevage des chironomes est réalisé selon les normes AFNOR (2004) et Environnement Canada (1997), relatives à la toxicité des sédiments sur *C. riparius*, au sein du laboratoire EcoLab sur le site de l'ENSAT. La souche initiale est fournie par l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (ENTPE, LEHNA, Vaulx-en-Velin, France). L'élevage se déroule dans des aquariums en verre d'une capacité de 20 L et maintenus à une température de 21 ± 1°C avec une photopériode de 16h de jour et 8 h de nuit. Ces derniers sont remplis d'un fond de sable de Fontainebleau (3-4 cm) et de milieu de culture (60 L) adapté à ces organismes (Annexe 1). L'aquarium est surmonté d'un couvercle muni de glissières à sa base. Ceci permet de glisser un support solide lors de l'entretien pour éviter l'évasion des adultes, tout en permettant leur vol et leur reproduction. L'aération est assurée par un tuyau souple relié à une pompe à air (TETRA APS 300). De façon à ne pas créer de remous en surface ou dans les sédiments, le bullage est léger et régulier. La nourriture des organismes est composée de Tétramin® (composition analytique présentée en annexe 1), un aliment pour poissons tropicaux, à raison de 400 mg par aquarium et par jour à partir d'une solution mère à 4 $g.L^{-1}$ d'eau distillée. Le Tétramin®, sous forme de flocons, est tout d'abord broyé (Moulinex Compact DJ305110, 350 W, 0,6 L) et dispersé par ultrasons (bain à ultra-sons Bioblock 89863 572 HF, Freq. 35 kHz, I : 0,73, Af : 50/60 HZ). La suspension mère est ensuite conservée à 4°C pendant 5 jours au maximum. Préalablement à l'ensemencement des aquariums, quelques masses d'œufs sont placées dans un cristallisoir contenant 1L de milieu de culture ainsi qu'une fine couche de sable et 150 mg de nourriture pour une durée de 48h. Après éclosion, les jeunes larves sont alors transférées en aquarium. Les premiers adultes apparaissent après un minimum de deux semaines. Un entretien régulier des aquariums d'élevage est réalisé en retirant les exuvies (enveloppe chitineuse que le corps des chironomes ont quitté lors des mues) et les masses d'œufs surnuméraires. Lorsque le

milieu devient trop turbide ou qu'un retard ou une absence d'émergence est noté, il est renouvelé aux deux-tiers.

Préalablement à chaque exposition expérimentale, les masses présentes en aquarium d'élevage sont récupérées pour être placées individuellement en piluliers contenant du milieu de culture. Les masses qui éclosent le même jour sont ensuite placées en cristallisoir, à raison de deux à quatre masses par contenant. L'intérêt de cette technique est de sélectionner des larves de même stade (et de même âge, avec moins de 24h de différence) afin d'optimiser un développement synchrone, et d'éviter tout biais lié à ce paramètre lors des tests d'exposition. Puis, les jeunes larves sont récupérées 48h après éclosion au moyen d'une pipette Pasteur équipée d'une poire. La probabilité de récolter des masses d'œufs étant plus grande suite à une première vague d'émergence, il est recommandé d'ensemencer un aquarium manuellement une vingtaine de jours avant le début de l'expérience.

3.2. L'amphibien *Xenopus laevis*

Les amphibiens s'avèrent particulièrement sensibles aux modifications environnementales induites par les activités anthropiques. Ils peuvent de ce fait représenter des bioindicateurs pertinents de la qualité d'un milieu, en particulier d'un milieu aquatique auquel leurs larves sont inféodées.

Parmi les amphibiens, les xénopes possèdent de nombreux avantages qui font d'eux un modèle approprié pour les études menées en laboratoire. Ils sont d'ailleurs les principaux organismes utilisés dans les présents travaux. Originaire d'Afrique australe, *Xenopus* laevis - aussi nommé xénope du Cap ou dactylère du Cap - est une espèce d'amphibien de l'ordre des anoures, caractérisés par l'absence de queue à l'état adulte. Leur famille est celle des pipidés qui regroupent des espèces purement aquatiques, ne remontant à la surface de l'eau que pour respirer. Dans leur milieu naturel, les xénopes sont retrouvés dans des milieux lentiques où ils se développent rapidement (58 jours à 23°C). Divisé en 66 stades (Nieuwkoop et Faber, 1956), leur développement comprend de nombreuses modifications morphologiques et cellulaires permettant progressivement le passage de l'œuf à l'adulte, en passant par l'embryon et la larve (Figure 3).

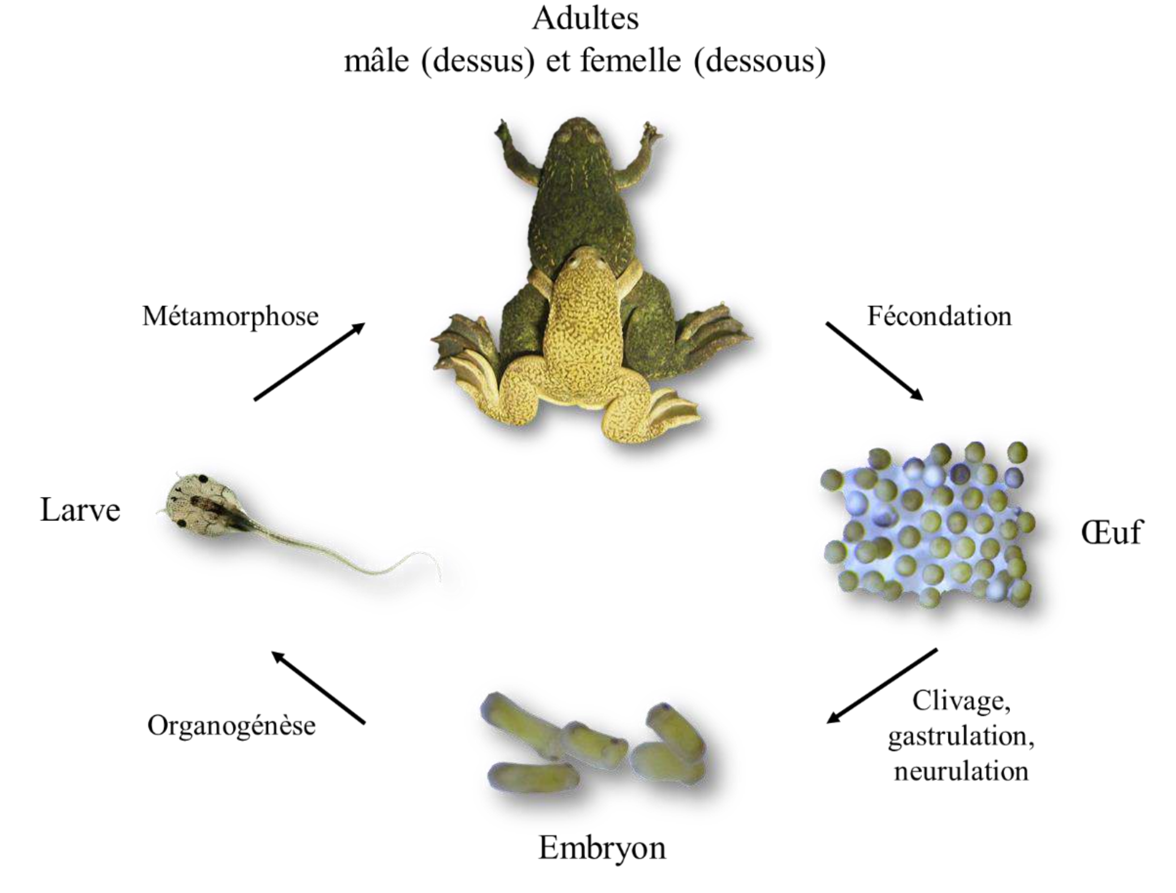


Figure 3. Cycle de développement de *Xenopus laevis*

Xenopus laevis présente de nombreux avantages pour les études en laboratoire, à commencer par sa relative facilité d'élevage, qu'il s'agisse des reproducteurs ou des larves. Les pontes sont inductibles toute l'année par stimulation hormonale des reproducteurs. Elles permettent l'obtention rapide d'une grande quantité de larves de par leur abondance (jusqu'à 2000 œufs par ponte) et la rapidité de leur développement. Si cette espèce est largement utilisée en biologie du développement et en biologie moléculaire, elle est aussi un modèle de choix en écotoxicologie. Sa pertinence dans ce domaine repose sur une grande sensibilité aux contaminants aquatiques, notamment du fait de sa grande perméabilité tégumentaire. En particulier, de nombreuses études ont démontré la sensibilité du xénope à des contaminants génotoxiques, si bien que l'espèce fait l'objet d'un test normalisé pour l'évaluation de la génotoxicité par mesure de l'induction des micronoyaux (ISO 21427-1, 2006). Ces aberrations chromosomiques ayant lieu pendant la division cellulaire, leur observation doit se faire au moment où l'index mitotique est le plus haut. Le test doit donc commencer au stade 50 de développement du xénope (Nieuwkoop et Faber, 1956), qui est caractérisé par une constriction à la base du membre postérieur (Figure 4) chez des larves âgées de deux à trois semaines.

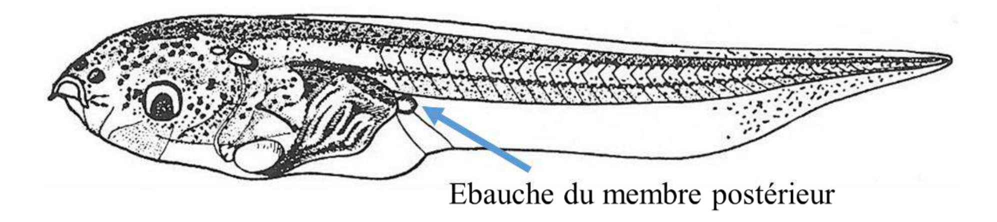


Figure 4. Larve de *Xenopus laevis* au stade 50 (d'après Nieuwkoop et Faber, 1956)

C'est à partir de ces larves que nous avons réalisé les expositions aux NPC, et non de l'embryon ou de l'adulte. Leur anatomie générale, présentée par la Figure 5, révèle une peau transparente ponctuée de chromatophores (cellules chargées de pigments noirs), à ne pas confondre avec les nanoparticules de carbone utilisées par la suite. Cette pigmentation est plus intense au niveau de certaines zones, comme les organes olfactifs, le cerveau, et autour des vaisseaux sanguins. Les viscères ne sont pas directement visibles et sont protégées par une membrane argentée (ainsi qu'une membrane translucide). Par contre, la transparence des organes comme les corbeilles branchiales situées en arrière de la cavité buccale permet de visualiser (macroscopiquement) la présence d'agglomérats particulaires (nourriture et/ou NPC). Les corbeilles branchiales ont en effet un double rôle, assurant une partie de la respiration de la larve (avec la peau et les poumons) et permettant de filtrer l'eau de manière à accumuler les particules alimentaires avant que celles-ci rejoignent le tractus digestif.

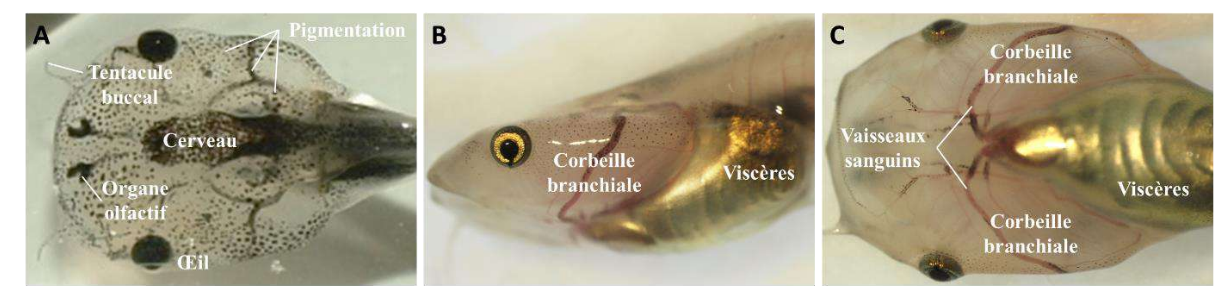


Figure 5. Détails anatomiques d'une larve de xénope. A : vue dorsale ; B : vue latérale ; C : vue ventrale.

L'obtention des larves pour l'expérimentation passe au préalable par l'élevage des reproducteurs au laboratoire Ecolab sur le site de l'ENSAT. Les adultes mâles et femelles sont élevés dans une salle thermostatée (23 ± 1°C), séparément, en aquariums à 22 ± 1°C avec une photopériode de 8h de jour et 16h de nuit. Ils sont nourris une fois par semaine avec du cœur de bœuf et deux fois par semaine avec des granulés prévus pour élevage piscicole (Trouw France SA). La reproduction *in vivo* est stimulée par injection hormonale chez un couple choisi (mâle : 50 UI de Gonadotrophine Sérique de jument 500 (Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin, PMSG ; MSD, France) ; femelle : 750 UI de Gonadotrophine Chorionique Humaine GCH 1500 (Human Chorionic Gonadotropin, HCG ; MSD, France)). Le couple est

alors placé dans le calme à l'obscurité en aquarium de reproduction maintenu à 22 ± 1°C. 48h après la ponte, les reproducteurs sont transférés en aquarium d'élevage pendant un minimum de trois mois jusqu'à leur prochain accouplement. Les œufs ainsi pondus évoluent rapidement jusqu'à devenir des larves aptes à se nourrir de manière autonome environ quatre jours après la ponte. Ces jeunes larves sont alors transférées en aquarium où elles sont nourries quotidiennement avec de la nourriture pour poissons d'ornement herbivores (TetraPhyll® ; Annexe 1) finement broyée, jusqu'à atteindre le stade expérimental souhaité (entre deux et trois semaines après fertilisation). La maintenance de ces aquariums d'élevage est assurée par un renouvellement partiel de l'eau tous les jours (un tiers du volume est remplacé).

3.3. L'amphibien *Pleurodeles waltl.*

Pleurodeles waltl., ou pleurodèle de Waltl, est une espèce d'urodèles appartenant à la famille des salamandridés dont l'aire de répartition s'étend de la péninsule ibérique jusqu'au Maroc. A l'inverse des xénopes, les pleurodèles conservent leur queue à l'état adulte. Leur développement pré-métamorphique est relativement long comparé à celui des xénopes puisqu'il est de l'ordre de 110 jours dans l'eau à 18°C. Il implique de nombreuses modifications morphologiques et anatomiques, correspondant à 56 stades de développement selon la table décrite par Gallien & Durocher (1957). C'est durant cette phase qu'a lieu l'organogénèse avec notamment l'apparition des branchies externes et des membres. Par ailleurs, les branchies régressent pendant la métamorphose pour laisser progressivement place à des poumons, tandis que la peau devient plus épaisse et rugueuse. Les principales étapes du cycle du développement de *Pleurodeles waltl.* sont représentées par la Figure 6.

Cette espèce présente des avantages pour les études écotoxicologiques en laboratoire. Comme le pleurodèle vit essentiellement en milieu aquatique (les adultes sortent peu ou pas de l'eau) et que sa peau est très perméable, il est susceptible d'être directement impacté par d'éventuels contaminants aquatiques capables d'entrer en contact avec le flux sanguin. De plus, les larves peuvent être affectées *via* leurs branchies qui constituent une surface d'échange importante avec le milieu extérieur. Les larves présentent également une sensibilité accrue aux contaminants, ce qui fait d'elles des bioindicateurs pertinents. En outre, leur régime alimentaire carnivore dès les premiers stades du cycle de vie les rend susceptibles d'être contaminées de manière directe ou par voie trophique, ce qui souligne leur intérêt pour les études écotoxicologiques sur les chaines trophiques. En tant que modèle écotoxicologique, le pleurodèle est ainsi utilisé pour étudier l'impact de polluants sur son développement (Calevro *et al.*, 1999; Flament *et al.*, 2003), mais

aussi pour évaluer le potentiel génotoxique de divers contaminants (Fernandez *et al.*, 1993; Gauthier, 1996; Gauthier *et al.*, 1993; Gauthier et Mouchet, 2017; Siboulet *et al.*, 1984; Zoll-Moreux et Ferrier, 1999). Avant de s'étendre au xénope, le test normalisé (AFNOR, 2000 ; ISO, 2006) de détection des micronoyaux chez le pleurodèle, ou test de Jaylet (Jaylet *et al.*, 1986), était le seul test de génotoxicité *in vivo* existant sur vertébré aquatique. La réalisation de ce test nécessite des larves au stade 53 selon la table de développement de Gallien & Durocher (1957), stade où l'index mitotique élevé maximise la probabilité d'apparition de micronoyaux dans les érythrocytes. Ce stade est caractérisé par l'ébauche d'un cinquième doigt aux membres postérieurs des larves (Figure 7).

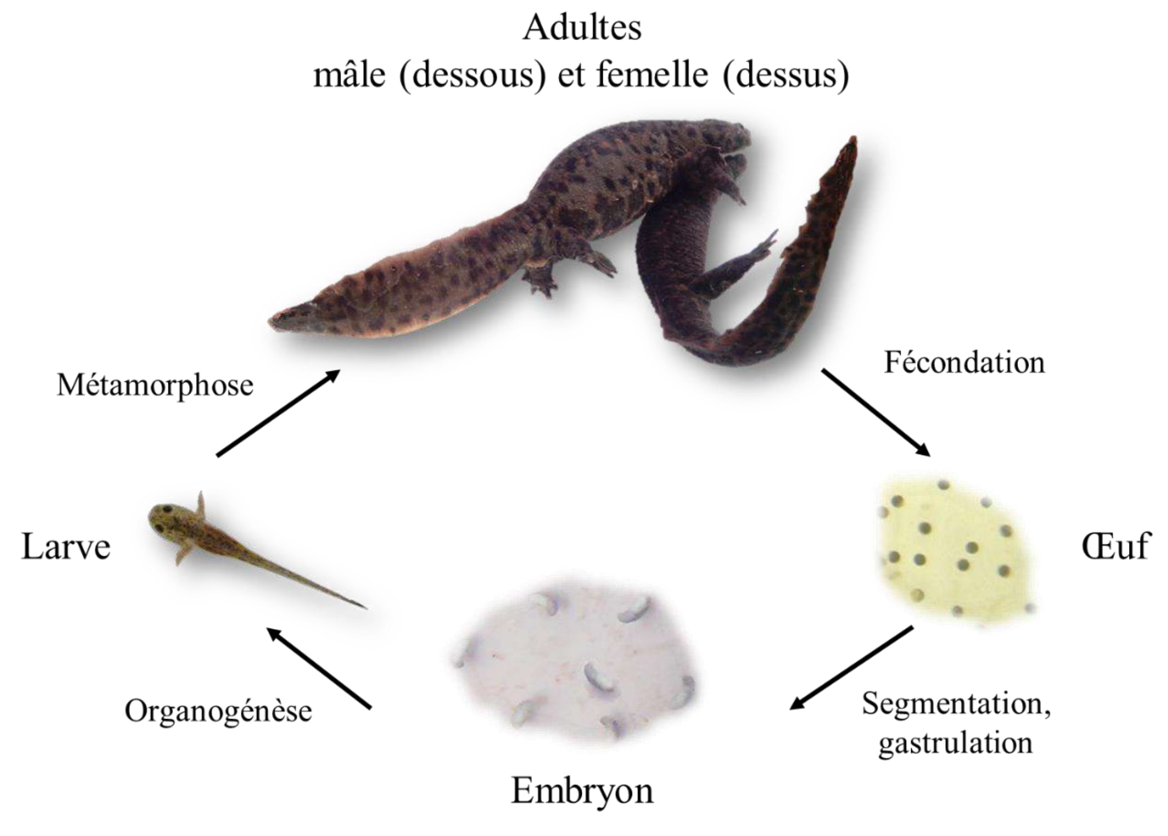


Figure 6. Cycle de développement de *Pleurodeles waltl.*

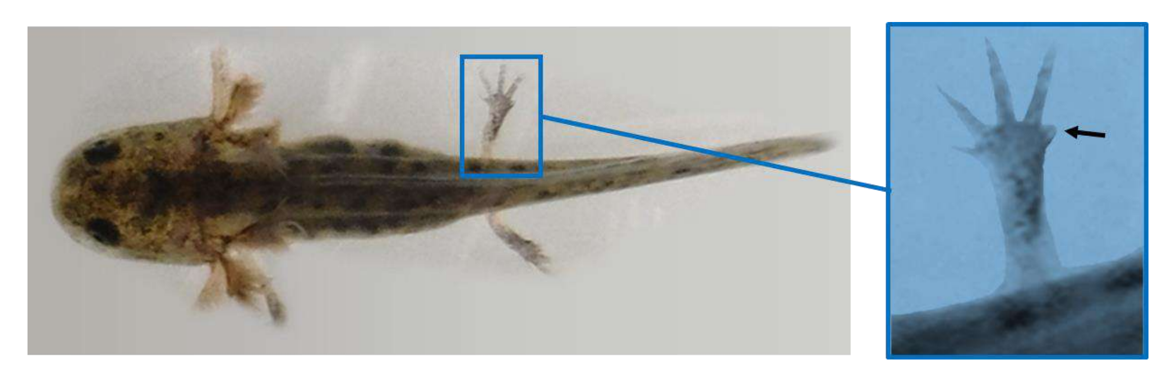


Figure 7. Larve de *Pleurodeles waltl.* au stade 53 de la table de développement de (Gallien et Durocher, 1957). Un bourgeon correspondant au cinquième doigt (montré par la flèche) apparait sur les membres postérieurs.

L'obtention de larves de pleurodèles au stade requis pour l'expérimentation passe avant tout par l'élevage de reproducteurs au laboratoire Ecolab sur le site de l'ENSAT. Les adultes sont élevés en salle thermostatée (19 ± 1°C) en aquarium contenant de l'eau de ville déchlorée à 18 ± 1°C, suivant une photopériode de 8h de jour et 16h de nuit. Ils sont nourris tous les deux jours avec du cœur de bœuf. Mâles et femelles ne sont regroupés que lors des périodes de reproduction (de septembre à octobre et de janvier à mars) où la fécondation se fait alors de manière naturelle (sans injection hormonale). Après la ponte, les œufs sont récupérés et placés dans des bassines d'eau isolées avant d'éclore, environ dix jours plus tard. Au départ, l'apport énergétique des jeunes larves se base sur les réserves de leur sac vitellin. Elles sont ensuite nourries quotidiennement avec des nauplies d'artémies (*Artemia salina*), jusqu'à ce que leur taille leur permette d'ingérer des proies plus grosses : des chironomes congelés, également donnés de manière quotidienne. Les larves sont ainsi élevées en eau de ville déchlorée (généralement renouvelée tous les jours) jusqu'au stade 53, environ deux mois après la ponte.

4. Gestion des déchets contaminés par les NPC

Aucune règlementation spécifique au traitement des NPC en tant que déchets (ni aux matériaux en étant constitués et susceptibles d'en libérer) n'existe à ce jour. Il en est de même pour les suspensions liquides et les objets solides contaminés. Les laboratoires de recherche et les industries produisant ou utilisant des NPC ont pris l'habitude de dissocier ces déchets de la filière de traitement des déchets classiques et règlementés en les faisant incinérer à haute température.

Dans notre cas, le matériel solide à usage unique contaminé par les NPC (par exemple les gants, le papier absorbant, divers contenants plastiques), de même que les restes biologiques des organismes exposés aux NPC ont été stockés dans des seaux blancs en polypropylène règlementaires et spécifiques (capacité de 30 L). Puis, chaque contenant a été identifié (nom du laboratoire, équipe, détails des principaux produits composant le déchet, masse) avant d'être pris en charge par la société spécialisée Labo Service (SUEZ RR IWS, Castelsarrasin) afin d'être incinérés.

D'autre part, la verrerie et le matériel réutilisable ont été décontaminés par balnéation dans de l'eau du robinet contenant un agent de nettoyage tensioactif (Decon90, Decon Laboratories Limited, Angleterre) pendant 24h (pouvant être poursuivi par un traitement sous ultrasons), suivi d'un rinçage à l'eau du robinet. La décontamination de la verrerie a été complétée par un traitement à l'acide (HNO_3 2%) pendant 24h avant un nouveau rinçage à l'eau du robinet.

Les déchets liquides produits (c'est-à-dire les milieux d'exposition contenant les NPC et les eaux de nettoyage) ont quant à eux été stockés dans des bidons règlementaires de 10 L en polyéthylène à haute densité. Chaque contenant a également été identifié (nom du laboratoire, équipe, détails des principaux produits composant le déchet, masse) avant d'être pris en charge par la société spécialisée Labo Service (SUEZ RR IWS, Castelsarrasin).

Références bibliographiques

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (Anses), 2011. Avis relatif à « l'évaluation des risques liés au GRAPHISTRENGTH C100 réalisée dans le cadre du programme Genesis »; Saisine n° 2007-SA-0417.

Bortolamiol, T., Lukanov, P., Galibert, A., Soula, B., Lonchambon, P., Datas, L., Flahaut, E., 2014. Double-walled carbon nanotubes : Quantitative purification assessment , balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening. Carbon N. Y. 78, 79–90. doi:10.1016/j.carbon.2014.06.051

Bourdiol, F., 2013. Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien Xenopus laevis: synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage. Université de Toulouse.

Calevro, F., Campani, S., C., F., Batistoni, R., Deri, P., Bucci, S., Ragghianti, M., Mancino, G., 1999. Bioassays for testing effects of Al, Cr and Cd using development in the amphibian Pleurodeles waltl and regeneration in the planarian Dugesia etrusca. Aquat. Ecosyst. Heal. Manag. 2, 281–288. doi:10.1016/S1463-4988(99)00032-9

Dias, V., Vasseur, C., Bonzom, J.-M., 2008. Exposure of Chironomus riparius larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. Chemosphere 71, 574–581. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.029

Environnement Canada, 1997. Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius) dans les sédiments. SPE1/RM/32.

Faria, M.S., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2007. The use of Chironomus riparius larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 218–226. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.11.018

Fernandez, M., L'Haridon, J., Gauthier, L., Zoll-Moreux, C., 1993. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater

pollutants and radiations. Initial assessment. Mutat. Res. 292, 83‑99.

Flament, S., Kuntz, S., Chesnel, A., Grillier-Vuissoz, I., Tankozic, C., Penrad-Mobayed, M., Auque, G., Shirali, P., Schroeder, H., Chardard, D., 2003. Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in Pleurodeles waltl (urodele amphibian). Aquat. Toxicol. 64, 143‑153. doi:10.1016/S0166-445X(03)00042-0

Gallien, L., Durocher, M., 1957. Table chronologique du developpement chez Pleurodeles waltll Michah. Bull. Biol. Fr. Belgique 91, 97‑114.

Gauthier, L., 1996. The amphibian micronucleus test, a model for in vivo monitoring of genotoxic aquatic pollution. Alytes, Int. J. Batrachology 14, 53‑84.

Gauthier, L., Mouchet, F., 2017. Genotoxicity in urodele amphibians Pleurodeles waltl and Ambystoma mexicanum (Lissamphibia, Caudata) exposed to freshwater pollutants: a historical view, in: Larramendy, M.L. (Éd.), Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional aquatic models. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 347‑370. doi:10.1039/9781782629887-00347

Gauthier, L., Van der Gaag, M.A., L'Haridon, J., Ferrier, V., Fernandez, M., 1993. In vivo detection of waste water and industrial effluent genotoxicity: use of the Newt Micronucleus test (Jaylet test). Sci. Total Environ. 138, 249‑269. doi:10.1016/0048-9697(93)90419-7

Gigault, J., Grassl, B., Lespes, G., 2012. Size characterization of the associations between carbon nanotubes and humic acids in aqueous media by asymmetrical flow field-flow fractionation combined with multi-angle light scattering. Chemosphere 86, 177‑182. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.10.009

Griffiths, R.W., 1992. Effects of pH on community dynamics of chironomidae in a large river near Sudbury, Ontario. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49, 76‑86. doi:10.1139/f92-302

Grillo, R., Rosa, A.H., Fraceto, L.F., 2015. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. Chemosphere 119, 608‑619. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.049

ISO 21427-1, 2006. Water Quality-Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei-Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae; International Organization for Standardization. Geneva.

Janssens De Bisthoven, L.G., Timmermans, K.R., Ollevier, F., 1992. The concentration of cadmium, lead, copper and zinc in Chironomus gr. thummi larvae (Diptera, Chironomidae) with deformed versus normal menta. Hydrobiologia 239, 141‑149.

Jaylet, A., Deparis, P., Ferrier, V., Grinfeld, S., Siboulet, R., 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt Pleurodeles waltl to detect mutagens in fresh-water pollution. Mutat. Res. 164, 245‑257.

Konrad, J.-M., Gabezas, F.A.V., 2008. Chaire industrielle de recherche en exploitation des infrastructures soumises au gel, phase II - Caractérisation des particules fines d'un matériau granulaire de fondation par l'essai au bleu de méthylène - Rapport GCT-2008-01. Québec.

Landois, P., 2008. Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de

carbone. Université de Toulouse.

Mouchet, F., Gauthier, L., 2014. Rapport final. Ecotoxicité des nanotubes de carbone : bilan des travaux du laboratoire Nautile sur la période (2008 – 2013). Laboratoire Commun NAUTILLE : NanotUbes et écoToxIcoLogiE, rapport de l'expertise de l'évaluation des risques liés au Graphistreng.

Nair, P.M.G., Park, S.Y., Choi, J., 2013. Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in Chironomus riparius. Chemosphere 92, 592‑599. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.060

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17, 372‑386. doi:10.1007/s10646-008-0214-0

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1956. Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. North-Holland, Amsterdam.

Oberholster, P.J., Musee, N., Botha, A., Chelule, P.K., Focke, W.W., Ashton, P.J., 2011. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate Chironomus tentans larvae. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 416‑423. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.12.012

OECD, 2004a. Test No. 218: Sediment-water chironomid toxicity using spiked sediment. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris.

OECD, 2004b. Test No. 219: Sediment-water chironomid toxicity using spiked water. Organisation for Economic Co-operation and Development.

Oeurng, C., Sauvage, S., Coynel, A., Maneux, E., Etcheber, H., Sanchez-Pérez, J.-M., 2011. Fluvial transport of suspended sediment and organic carbon during flood events in a large agricultural catchment in southwest France. Hydrol. Process. 25, 2365‑2378. doi:10.1002/hyp.7999

Péry, A.R.R., Geffard, A., Conrad, A., Mons, R., Garric, J., 2008. Assessing the risk of metal mixtures in contaminated sediments on Chironomus riparius based on cytosolic accumulation. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 869‑873. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.04.009

Siboulet, R., Grinfeld, S., Deparis, P., Jaylet, A., 1984. Micronuclei in red blood cells of the newt Pleurodeles waltl Michah: induction with X-rays and chemicals. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 125, 275‑281. doi:10.1016/0027-5107(84)90077-0

Van Ginkel, C.G., Gayton, S., 1996. The biodegradability and nontoxicity of carboxymethyl cellulose (DS 0.7) and intermediates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 270‑274. doi:10.1002/etc.5620150307

Verneuil, L., 2015. Toxicité environnementale et écotoxicité de nanotubes de carbone chez des diatomées benthiques : de la cellule au biofilm. Université Paul Sabatier France, PhD thesis.

Walshe, B.M., 1947. Feeding mechanisms of Chironomus larvae. Nature 160, 474.

Zoll-Moreux, C., Ferrier, V., 1999. The Jaylet test (newt micronucleus test) and the micronucleus test in xenopus: two in vivo tests on amphibia evaluation of the genotoxicity

of five environmental pollutants and of five effluents. Water Res. 33, 2301–2314. doi:10.1016/S0043-1354(98)00464-3

CHAPITRE 3

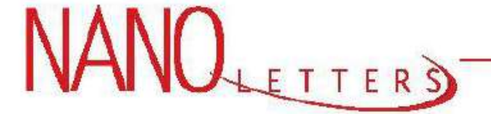
COMPARAISON DES EFFETS DE DIFFÉRENTS NANOCARBONES SUR LA CROISSANCE DE *XENOPUS LAEVIS* : APPROCHE PAR UNE NOUVELLE MÉTRIQUE

1. Un modèle pour décrire la toxicité de différents allotropes de carbone chez *X. laevis* : la surface spécifique comme meilleur descripteur de l'inhibition de croissance

Résumé :

Les nanoparticules manufacturées telles que les graphènes, les nanodiamants et les nanotubes de carbone correspondent à différents allotropes de carbone et sont parmi les meilleures candidates pour perfectionner de nombreuses applications technologiques ou en développer de nouvelles. Il est donc possible qu'elles soient libérées dans l'environnement à chaque étape de leur cycle de vie : production, utilisation et recyclage/élimination. Connu pour être un réceptacle majeur de pollution, le compartiment aquatique pourrait être particulièrement impacté. Par convention, la toxicité d'un composé est évaluée à l'aide de la concentration massique comme mesure quantitative de l'exposition. Néanmoins, plusieurs études ont souligné qu'une telle unité n'est pas la meilleure pour décrire la toxicité observée en présence de nanoparticules. En effet, la spécificité de l'échelle nanométrique implique une augmentation exponentielle du rapport d'atomes présents à la surface comparé au nombre total d'atomes, lorsque la taille des particules diminue. La pertinence de l'unité massique peut ainsi être remise en question. Ici, nous exposons des larves de *Xenopus laevis in vivo* à différentes nanoparticules de carbone pendant 12 jours afin d'évaluer la toxicité chronique induite. Notre objectif est de comparer l'inhibition de croissance causée en présence de différentes nanoparticules, les concentrations de celles-ci étant exprimées en fonction de leur masse ($mg.L^{-1}$), de leur nombre ($nombre.L^{-1}$), ou de leur surface ($m^2.L^{-1}$). Nos résultats montrent clairement que la surface des particules est le paramètre le plus pertinent pour décrire la toxicité des différents allotropes de carbone.

L'article qui suit fait état de la démarche utilisée pour réaliser une évaluation du risque écotoxicologique à l'aide d'une unité de mesure plus réaliste : la surface. Quatre nanoparticules de carbone sont utilisées : du graphène multi-feuillets (FLG : « few layer graphene » en anglais), des nanotubes de carbone double et multi-parois (DWCNTs et MWCNT : « double-walled » et « multi-walled carbon nanotubes » en anglais), et du nanodiamant (ND). Les informations concernant leur provenance, leur synthèse, leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi que le protocole de dispersion physique et la méthode de contamination des milieux d'exposition sont présentés dans le Supporting Information en Annexe 2. Les calculs du nombre de particules et de la surface totale y sont aussi détaillés, de même que le modèle hiérarchique Bayésien utilisé.



Letter
pubs.acs.org/NanoLett

Surface Area of Carbon Nanoparticles: A Dose Metric for a More Realistic Ecotoxicological Assessment

Antoine Mottier,[†,‡] Florence Mouchet,[†,‡] Christophe Laplanche,[†,‡] Stéphanie Cadarsi,[†,‡] Laura Lagier,[†,‡] Jean-Charles Arnault,[§] Hugues A. Girard,[§] Verónica León,[∥] Ester Vázquez,[∥] Cyril Sarrieu,[⊥,#] Éric Pinelli,[†,‡] Laury Gauthier,[†,‡] and Emmanuel Flahaut*[,⊥,#]

[†]ECOLAB, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[‡]ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[§]CEA LIST, Diamond Sensors Laboratory, F-91191 Gif sur Yvette, France

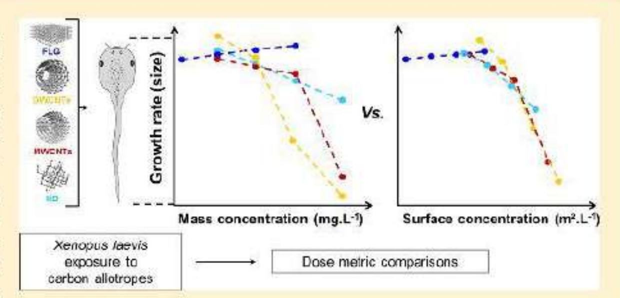
[∥]Departamento da Quimica Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Camilo José Cela 10, 13071 Ciudad Real, Spain

[⊥]Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, F-31062 Toulouse cedex 9, France

[#]CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France

Supporting Information

ABSTRACT: Engineered nanoparticles such as graphenes, nanodiamonds, and carbon nanotubes correspond to different allotropes of carbon and are among the best candidates for applications in fast-growing nanotechnology. It is thus likely that they may get into the environment at each step of their life cycle: production, use, and disposal. The aquatic compartment concentrates pollutants and is expected to be especially impacted. The toxicity of a compound is conventionally evaluated using mass concentration as a quantitative measure of exposure. However, several studies have highlighted that such a metric is not the best descriptor at the nanoscale. Here we compare the inhibition of *Xenopus laevis* larvae growth after in vivo exposure to different carbon nanoparticles for 12 days using different dose metrics and clearly show that surface area is the most relevant descriptor of toxicity for different types of carbon allotropes.



KEYWORDS: *Carbon allotropes, graphene, carbon nanotubes, nanodiamonds, metrics comparison, ecotoxicity*

Engineered nanoparticles (NPs) such as graphenes,[1] nanodiamonds (NDs),[2] and carbon nanotubes (CNTs)[3] have a number of unique features that make them behave differently from classical chemical products and bulk materials: "small act differently".[4,5] The ratio of surface to total atoms or molecules increases exponentially with decreasing particle size.[5] Increased surface reactivity predicts that nanoparticles should exhibit greater biological activity per unit mass compared with larger particles.[6] This suggests that the expressed mass concentration would fail to correctly predict the biological effect of NPs.[6−8] The aim of this study is to find the most relevant dose metric to quantify the response of exposure to carbon-based nanoparticles (C-NPs) having different structures and morphologies.

For this purpose, an animal model widely recognized in ecotoxicology was used: the larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. Exposure of larvae was based on the international standardized bioassay procedure (ISO, 2006).[9] The amphibian model offers numerous advantages, including easy breeding, permeable skin, and gills,[10] and has previously been used for the ecotoxicological assessment of NPs (e.g., cerium dioxide[11] and CNTs[12−14]). In order to find the most appropriate dose metric, exposures were conducted for four different types of C-NPs: few-layer graphene (FLG), NDs, double-walled CNTs (DWCNTs), and multiwalled CNTs (MWCNTs) (Figure 1). On the basis of previous studies on CNTs,[12,15] we focused on growth inhibition as an especially sensitive end point. Indeed, growth inhibition represents an integrative toxicological response that includes direct and indirect effects of the different NPs, reflecting the global health status of the living organisms.

X. laevis males were injected with 50 IU of pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG) 500 (Intervet, France, [9002-70-4]) and the females with 750 IU of human chorionic gonadotropin (HCG) (Organon, France, [9002-61-3]) in order to induce spawning. Viable eggs were maintained in a tank filled with tap

Received: January 27, 2016
Revised: April 12, 2016
Published: April 28, 2016



DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b00348
Nano Lett. 2016, 16, 3514−3518

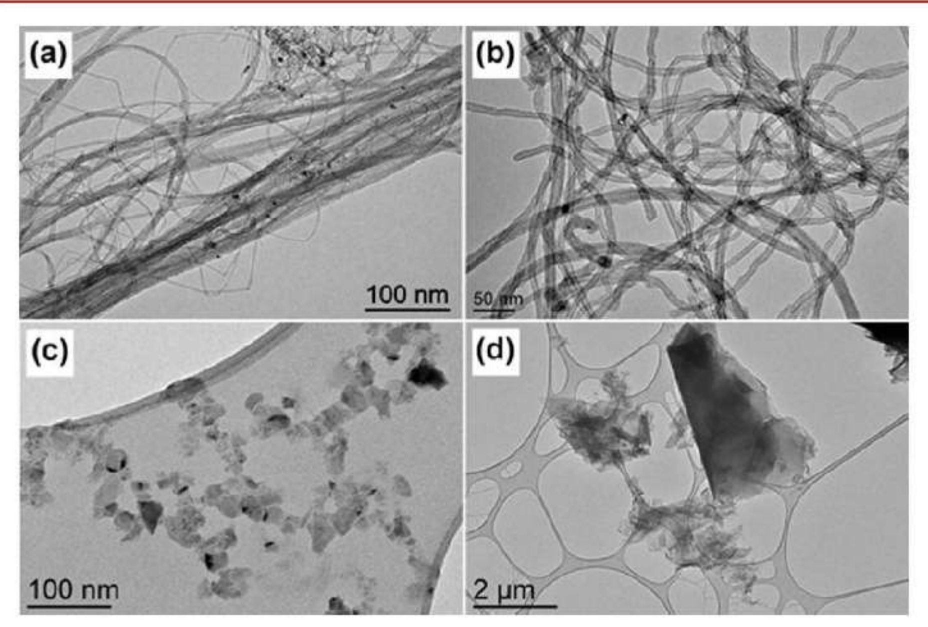


Figure 1. Transmission electron microscopy micrographs of (a) DWCNTs, (b) MWCNTs, (c) NDs, and (d) FLG.

water filtered through active charcoal. The larvae were bred at 20–22 °C until they reached a development stage appropriate for experimentation (i.e., stage 50).[16]

The exposures were performed under semistatic conditions (ISO, 2006).[9] *X. laevis* larvae were exposed in groups of 15 (FLG) or 20 (DWCNTs, MWCNTs, and NDs) larvae in crystallizing dishes for 12 days in reconstituted water (distilled tap water + nutritive salts [294 mg·L^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 123.25 mg L^{-1} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64.75 mg L^{-1} $NaHCO_3$, 5.75 mg L^{-1} KCl]). The exposure concentrations were achieved by adding a concentrated solution of nanoparticles. Detailed procedures used to obtain the various nanoparticles are provided in the Supporting Information. Besides C-NP-exposed larvae, negative controls were also used. The temperature was 22.0 ± 0.5 °C, and the larvae were submitted to a 12 h/12 h light/dark cycle. The larvae were fed every day on dehydrated and crushed fish food (Tetraphyll).

Growth inhibition was evaluated by measuring the length of each larva at the beginning (t_0) and the end (t_{12}) of the exposure. Length measurements were performed with the ImageJ software (NIH Image, Bethesda, MD, USA). The length data were standardized as follows:

$$\left(\frac{\mathrm{Lt}_{12} - \mathrm{MLt}_0}{\mathrm{MLt}_0} \times 100\right) \times \left(\frac{100}{\mathrm{MLCt}_{12}}\right)$$

where Lt_{12} is the length of one individual larva at 12 days, MLt_0 is the mean length of the group at 0 days, and MLCt_{12} is the mean length of the control group at 12 days

Amphibian dose–response growth inhibition was modeled by predicting the normalized size using the following two-parameter logistic equation:

$$E(\mathrm{Size}_{ijk}) = \frac{100}{1 + \left(\frac{x_{ijk}}{\mathrm{EC}_{50,i}}\right)^{1/\alpha_i}}$$

where x_{ijk} is the dose and *i*, *j*, and *k* are the indices over dose metrics, NPs, and concentrations, respectively. $\mathrm{EC}_{50,i}$ is the value of dose metric *i* when the predicted size reaches 50%; the slope at this point is $-25/\mathrm{EC}_{50,i}\alpha_i$. Unequal residual variances were taken into account by modeling the observed sizes as independent normally distributed variates:

$$\mathrm{Size}_{ijk} \sim \mathrm{Normal}(E(\mathrm{Size}_{ijk}), \sigma_{jk}^2)$$

where σ_{jk}^2 is the residual variance of the predicted size for NP *j* at concentration *k*. Values for σ_{jk}^2 are issued from within-treatment measurement error variances. Maximum-likelihood (ML) estimates are equivalent to least-squares (LS) regression estimates under the hypothesis of normally distributed residual errors. Consequently, ML estimates were computed by nonlinear weighted LS regression, in which case the regression weights are $1/\sigma_{jk}^2$. Three models were compared, one per dose metric, and their performances were evaluated via their R^2 and Akaike information criterion (AIC) values, where larger R^2 and smaller AIC are considered better. The evidence ratio, given by $\exp[(\mathrm{AIC}_i - \mathrm{AIC}_j)/2]$, where AIC_i and AIC_j are the AIC estimates for dose metrics *i* and *j*, indicates how much more likely dose metric *j* is than dose metric *i* to be the best predictor for growth inhibition given the set of the three dose metrics and the data. Statistical computations were carried out in R.[17]

The dose metrics were also measured with errors. Consequently, the data had to be fitted using nonlinear weighted LS errors-in-variables regression, which requires advanced statistical procedures. This was implemented as a hierarchical Bayesian model (HBM), which is presented in the Supporting Information.

The different doses of C-NPs to which *Xenopus* larvae were exposed and the comparisons between the metrics are summarized in Table 1. The detailed procedures and methods used to obtain these different metrics are provided in the Supporting Information together with the physicochemical characterizations of the C-NPs.

Statistically significant growth inhibition was evidenced after a 12 day exposure to C-NPs. At first sight and on the basis of mass concentrations, growth inhibition seemed to strongly

DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b00348
Nano Lett. 2016, 16, 3514–3518

Table 1. Corresponding Metrics for Each Dose (A−E) of Nanoparticles to Which *X. laevis* Larvae Were Exposed

C-NP	mass concentration (mg L^{-1})					number of particles (L^{-1})					surface concentration (m^2 L^{-1})				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
FLG	1.00×10^{-2}	1.00×10^{-1}	1.00×10^{0}	1.00×10^{1}	nt	6.14×10^{5}	6.14×10^{6}	6.14×10^{7}	6.14×10^{8}	nt	1.00×10^{-4}	1.00×10^{-3}	1.00×10^{-2}	1.00×10^{-1}	nt
NDs	nt	1.00×10^{-1}	1.00×10^{0}	1.00×10^{1}	5.00×10^{1}	nt	2.61×10^{10}	2.61×10^{11}	2.61×10^{12}	1.31×10^{13}	nt	2.10×10^{-2}	2.10×10^{-1}	2.10×10^{0}	1.05×10^{1}
DWCNTs	nt	1.00×10^{-1}	1.00×10^{0}	1.00×10^{1}	5.00×10^{1}	nt	1.21×10^{9}	1.21×10^{10}	1.21×10^{11}	3.03×10^{12}	nt	9.80×10^{-2}	9.80×10^{-1}	9.80×10^{0}	4.90×10^{1}
MWCNTs	nt	1.00×10^{-1}	1.00×10^{0}	1.00×10^{1}	5.00×10^{1}	nt	1.79×10^{7}	1.79×10^{8}	1.79×10^{9}	8.93×10^{9}	nt	2.35×10^{-2}	2.35×10^{-1}	2.35×10^{0}	1.18×10^{1}

depend on the type of C-NPs (Table 2). Compared with the negative control group, a significantly smaller size of larvae was observed after a 12 day exposure to NDs at 1 mg L^{-1} (dose C). Similar results were obtained for larvae exposed to DWCNTs and MWCNTs at 10 mg L^{-1} (dose D). Finally, no growth inhibition in larvae was observed after FLG exposure, whatever the tested dose. If a conventional analysis of these results with a comparison based on mass concentration was used, the conclusion would be that the DWCNTs are the most toxic C-NPs since they cause the strongest growth inhibition (Table 2 and Figure 2). The C-NP toxicity would have been sorted as follows: FLG < NDs < MWCNTs < DWCNTs.

However, as NPs behave differently from classical chemicals, the "traditional" approaches with mass concentrations could lead to misinterpretations. On the basis of studies from aerial toxicology with nanoparticles, a new approach was tried in order to "move beyond mass".[7] With the aim of finding the most relevant metric to compare the growth inhibition, the standardized lengths of *X. laevis* larvae were expressed against "nonclassical" metrics. Data were plotted versus number of particles per unit volume and the surface area per unit volume. Detailed procedures for calculation of these two metrics are given in the Supporting Information section. Briefly, the number of particles was calculated using simple geometrical hypotheses specific to each kind of nanoparticle and not considering aggregation/agglomeration. The specific surface areas (SSAs) of the C-NPs[18,19] were obtained experimentally using the Brunauer−Emmett−Teller (BET) method (N_2 adsorption).

Nonlinear two-parameter logistic regressions were applied to the growth data using each of the three different dose metrics as a predictor (Figure 2). Goodness of fit values using the three dose metrics were evaluated with R^2 and statistically compared by model selection using the AIC values. Expressing the length data versus the number of particles led to a poor fit ($R^2 = 0.57$). The fit was improved using mass concentration ($R^2 = 0.63$) and was best using the surface area ($R^2 = 0.88$). Similarly, model selection strongly favored surface area (AIC = 673.7) with respect to mass concentration (AIC = 691.2) or number of particles (AIC = 695.7). Consequently, models using either mass concentration or number of particles were omitted from further consideration and were 6311 and 59 874 times less probable, respectively, than the model using surface area to be the most concordant descriptor for growth inhibition.

Interestingly, growth inhibition did not depend on the allotropic form of carbon but seemed to mostly depend on the surface area of C-NPs. Furthermore, the conclusion obtained when the size of the animals was expressed as a function of the C-NP surface area was different from that obtained using mass concentration. The use of surface area concentration showed that the different nanoparticles could be considered as a single type of C-NPs. Moreover, the global area concentration for which a growth inhibition of 50% (EC_{50}) was obtained could be estimated and was found to be 7.47 m^2·L^{-1} (95% CI = 4.64−12.62 m^2·L^{-1}).

The growth inhibition mechanism appeared to mostly depend on the surface area of the C-NPs, which can be explained by several hypotheses. Exposure by ingestion was ascertained, and nanoparticles could enter the digestive tract. Guts filled with "black material" were observed for all of the exposed larvae compared with the controls. Furthermore, in earlier studies DWCNTs and MWCNTs were evidenced in the intestine lumen by Raman spectroscopy analysis, high-resolution transmission electron microscopy, or microwave permittivity

DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b00348
Nano Lett. 2016, 16, 3514−3518

Table 2. Growth in *X. laevis* Larvae Exposed to the Different C-NPs[a]

	NC	A	B	C	D	E
FLG	100.00 ± 4.30	88.90 ± 2.73	93.69 ± 2.86	94.42 ± 4.43	101.30 ± 2.22	nt
NDs	100.00 ± 2.10	nt	97.02 ± 3.23	84.18 ± 3.26*	73.21 ± 3.00***	59.75 ± 3.11***
DWCNTs	100.00 ± 11.36	nt	121.60 ± 6.81	91.32 ± 6.24	35.86 ± 5.53**	4.25 ± 2.77***
MWCNTs	100.00 ± 3.19	nt	94.78 ± 4.47	85.24 ± 2.61	82.19 ± 2.25*	20.30 ± 3.39***

[a]Results are given as the normalized mean (%) ± Standard Error of the Mean (SEM). "*" corresponds to a significantly different size of larvae compared to the negative control group (mean value) for $p \leq 0.05$; "**" corresponds to a significantly different size of larvae compared to the negative control group (mean value) for $p \leq 0.01$; "***" corresponds to a significantly different size of larvae compared to the negative control group (mean value) for $p \leq 0.001$. NC = negative control; each letter from A to E corresponds to a different concentration of C-NPs.

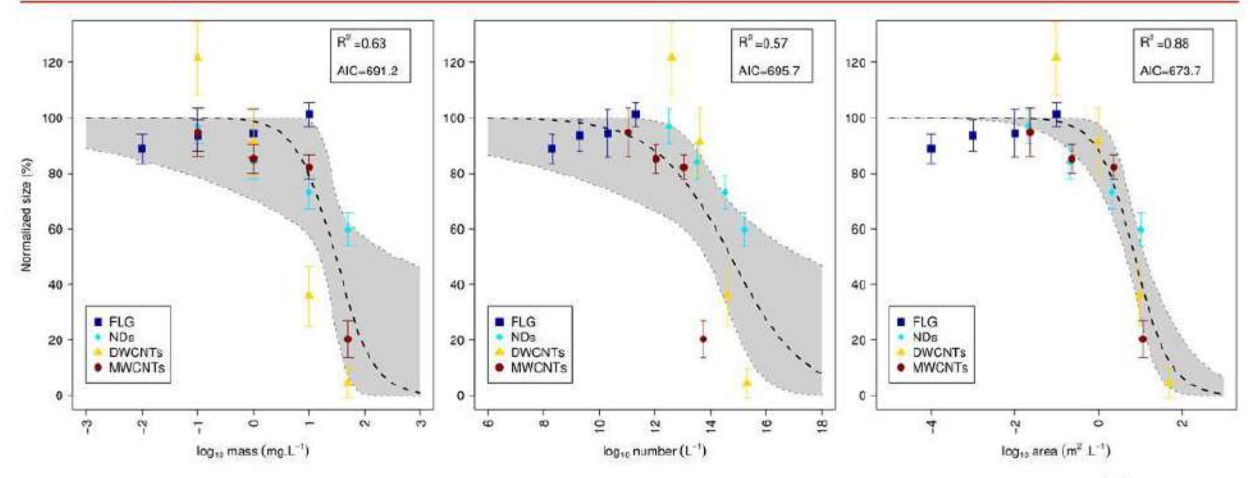


Figure 2. Growth inhibition in *X. laevis* larvae after a 12 day exposure to FLG, NDs, DWCNTs, and MWCNTs. Normalized size (%) is plotted vs the base-10 logarithms of three different metrics: mass concentration ($mg \cdot L^{-1}$), number concentration (L^{-1}), and surface area concentration ($m^2 \cdot L^{-1}$). Black dashed lines represent nonlinear regression model predictions, and shaded areas are 95% confidence intervals (CIs) on these. The 95% CIs on the mean sizes, which were computed from the experimental assays, are represented as vertical error bars.

measurements.[12,15,20] The presence of C-NPs in the digestive tract could therefore limit the exchange surfaces between the gut lumen and the internal wall, leading to a decrease in absorption of nutrients. Similarly, macro observations revealed the presence of "black material" in the branchial baskets. In *X. laevis* larvae, buccopharyngeal surfaces have a dual function: they serve in both food particle entrapment[21,22] and breathing. If these surfaces become coated with C-NPs, the efficiency of food intake could be reduced. Finally, C-NPs could interact with all of the external respiratory surfaces of *X. laevis* larvae and may withdraw oxygen from buccopharyngeal respiratory surfaces, skin, or lungs. When aquatic respiratory surfaces are saturated with C-NPs, the absorption of oxygen could be reduced. If the aquatic gas exchangers are not sufficient to extract oxygen from water, the larvae could use its lungs to complete the oxygen supply.[23] This aerial respiration has an energetic cost that could lead to reduced growth.[24] These two mechanisms may also interact and be jointly responsible for the size reduction of exposed animals.

The results and the hypotheses that were made are specific to the particular mode of exposure used (i.e., raw nanoparticles without any dispersant, semistatic exposure, and reconstituted water under normalized conditions). It is important to note that even with different C-NP physicochemical characteristics (i.e., structure and morphology), growth inhibition mostly depends on the surface area. Finally, it is important to note that the toxic effects with C-NPs were observed at nonenvironmentally realistic doses.[25] However, the computed effective area concentration ($EC_{50} = 7.47\ m^2 \cdot L^{-1}$) showed that in the case of high-surface-area NPs we could evidence growth inhibition at lower mass concentrations. For example, in the case of "perfect" graphene with a theoretical specific surface area of 2630 $m^2 \cdot g^{-1}$, the predicted mass concentration EC_{50} would be 2.8 $mg \cdot L^{-1}$.

The next step will be to test a new panel of C-NPs (e.g., oxidized) in order to corroborate the model of growth inhibition. The adequacy or inadequacy of the inhibition model would be fruitful and will provide key information to understand the role of surface chemistry but also intrinsic properties of each NP (atomic composition, dispersibility) in their degrees of toxicity.

This study shows that the usual approach based on mass concentrations fails to compare the toxicities of different C-NPs. Apart from papers on aerial nanotoxicology,[6,8,26−29] most of published data in nanoecotoxicology are based on mass concentration, and the provided physicochemical characterization is not enough to express the results versus surface area concentration. A full characterization of engineered C-NPs must be provided in every ecotoxicological study in order to allow the toxicity comparison of C-NPs, which should be done on the basis of surface area concentration when it is relevant. The use of this metric would help in the definition of a more realistic risk assessment strategy for carbon-based nanoparticles in the aquatic environment.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b00348.

DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b00348
Nano Lett. 2016, 16, 3514−3518

Nanoparticle features, nanoparticle dispersion protocols, protocols for contamination of the exposure media, calculation of particle number and total surface area, and hierarchical Bayesian modeling of errors-in-variables regression (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: flahaut@chimie.ups-tlse.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme under grant agreement n°604391 Graphene Flagship.

ABBREVIATIONS

AIC, Akaike information criterion; BET, Brunauer–Emmett–Teller; C-NPs, carbon-based nanoparticles; CI, confidence interval; CNTs, carbon nanotubes; DWCNTs, double-walled carbon nanotubes; FLG, few-layer graphene; HBM, hierarchical Bayesian model; HCG, human chorionic gonadotropin; LS, least-squares; ML, maximum-likelihood; MWCNTs, multi-walled carbon nanotubes; NDs, nanodiamonds; NPs, nano-particles; PMSG, pregnant mare's serum gonadotropin; SSA, specific surface area; SEM, standard error of the mean

REFERENCES

(1) Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V.; Firsov, A. A. *Science* **2004**, *306*, 666–669.

(2) Danilenko, V. V. *Phys. Solid State* **2004**, *46*, 595–599.

(3) Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.

(4) El-Sayed, M. A. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 326–333.

(5) Auffan, M.; Rose, J.; Bottero, J.-Y.; Lowry, G. V.; Jolivet, J.-P.; Wiesner, M. R. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 634–641.

(6) Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 823–839.

(7) Hull, M.; Kennedy, A. J.; Detzel, C.; Vikesland, P.; Chappell, M. A. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 10881–10882.

(8) Stoeger, T.; Reinhard, C.; Takenaka, S.; Schroeppel, A.; Karg, E.; Ritter, B.; Heyder, J.; Schulz, H. *Environ. Health Perspect.* **2006**, *114*, 328–333.

(9) *ISO/FDIS 21427-1. Water Quality—Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei—Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae*; International Organization for Standardization: Geneva, 2006.

(10) Gauthier, L. *Alytes* **1996**, *14*, 53–84.

(11) Bour, A.; Mouchet, F.; Verneuil, L.; Evariste, L.; Silvestre, J.; Pinelli, E.; Gauthier, L. *Chemosphere* **2015**, *120*, 230–236.

(12) Mouchet, F.; Landois, P.; Sarremejean, E.; Bernard, G.; Puech, P.; Pinelli, E.; Flahaut, E.; Gauthier, L. *Aquat. Toxicol.* **2008**, *87*, 127–137.

(13) Mouchet, F.; Landois, P.; Datsyuk, V.; Puech, P.; Pinelli, E.; Flahaut, E.; Gauthier, L. *Environ. Toxicol.* **2011**, *26*, 136–145.

(14) Bourdiol, F.; Mouchet, F.; Perrault, A.; Fourquaux, I.; Datas, L.; Gancet, C.; Boutonnet, J.-C.; Pinelli, E.; Gauthier, L.; Flahaut, E. *Carbon* **2013**, *54*, 175–191.

(15) Mouchet, F.; Landois, P.; Puech, P.; Pinelli, E.; Flahaut, E.; Gauthier, L. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 963–974.

(16) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis*; Nieuwkoop, P., Faber, J., Eds.; North Holland: Amsterdam, 1956.

(17) R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2015.

(18) Peigney, A.; Laurent, C.; Flahaut, E.; Bacsa, R. R.; Rousset, A. *Carbon* **2001**, *39*, 507–514.

(19) Laurent, C.; Flahaut, E.; Peigney, A. *Carbon* **2010**, *48*, 2994–2996.

(20) Bourdiol, F.; Dubuc, D.; Grenier, K.; Mouchet, F.; Gauthier, L.; Flahaut, E. *Carbon* **2015**, *81*, 535–545.

(21) Gradwell, N. *Acta Zool.* **1975**, *56*, 119–128.

(22) Feder, M. E.; Seale, D. B.; Borass, M. E.; Wassersug, R. J.; Gibbs, A. G. *J. Exp. Biol.* **1984**, *110*, 91–98.

(23) Feder, M. E.; Wassersug, R. J. *J. Exp. Biol.* **1984**, *108*, 231–245.

(24) Pandian, T. J.; Vivekanandan, E. *Hydrobiologia* **1976**, *49*, 33–39.

(25) Sun, T. Y.; Gottschalk, F.; Hungerbühler, K.; Nowack, B. *Environ. Pollut.* **2014**, *185*, 69–76.

(26) Sager, T. M.; Castranova, V. *Part. Fibre Toxicol.* **2009**, *6*, 15.

(27) Donaldson, K.; Stone, V. *Ann. Ist. Super. Sanita* **2003**, *39*, 405–410.

(28) Duffin, R.; Tran, L.; Brown, D.; Stone, V.; Donaldson, K. *Inhalation Toxicol.* **2007**, *19*, 849–856.

(29) Duffin, R.; Tran, C. L.; Clouter, A.; Brown, D. M.; MacNee, W.; Stone, V.; Donaldson, K. *Ann. Occup. Hyg.* **2002**, *46*, 242–245.

DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b00348
Nano Lett. 2016, 16, 3514–3518

2. La croissance de *X. laevis* en présence de nanoparticules de carbone dispersées de manière covalente ou non-covalente : une relation surface/effet toujours valable

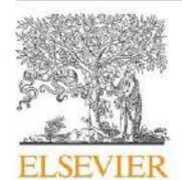
Résumé :

Les propriétés attractives des nanoparticules carbonées, telles que le graphène et ses dérivés, ou encore les nanotubes de carbone, leur confèrent de nombreuses possibilités d'applications dans divers domaines. Cela étant, même si ces nanoparticules peuvent être employées sous forme brute, leurs formes fonctionnalisées (comme oxydée par exemple) sont largement utilisées, notamment pour faciliter leur manipulation dans les processus industriels ou en laboratoire. A un moment de leur cycle de vie, ces particules sont vouées à se retrouver dans l'environnement, et notamment dans le compartiment aquatique, en tant que réceptacle majeur de polluants. Elles peuvent alors entrer en interaction avec les constituants de ce milieu complexe (comme la matière organique) et les êtres vivants. Etudier l'impact de ces nanoparticules chez les organismes aquatiques est donc essentiel.

A l'échelle nanométrique, des études récentes ont soulevé le fait que la surface spécifique devrait être utilisée, plutôt que l'unité conventionnelle en concentration massique, afin de décrire la toxicité de manière plus pertinente. En utilisant le modèle dose-réponse précédemment employé pour les nanocarbones bruts (Chapitre 3, partie 1.), la présente publication compare la toxicité chronique observée chez *X. laevis* après 12 jours d'exposition à des allotropes de carbone non seulement bruts, mais aussi oxydés, ou bien en présence de dispersants chimiques. L'objectif est donc de voir si la conclusion précédemment obtenue (à savoir : la surface spécifique est le meilleur paramètre descripteur de l'inhibition de croissance) peut également s'étendre à des particules dispersées de manière covalente ou non-covalente.

Nous montrons que la dispersion chimique n'influence pas la toxicité chronique observée, que ce soit *via* la chimie de surface (l'état d'oxydation), ou *via* l'ajout d'un dispersant chimique. Ce résultat est quelque peu surprenant vis-à-vis de ce qui est généralement rapporté dans la littérature, à savoir un effet biologique modifié en fonction de la chimie de surface des composés. Les hypothèses biologiques conduisant à l'inhibition de croissance sont discutées. Finalement, ces résultats confirment que la surface reste le paramètre le plus adéquat pour décrire l'inhibition de croissance.

Carbon 119 (2017) 72–81

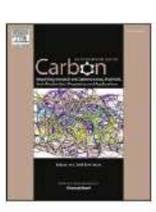


Contents lists available at ScienceDirect

Carbon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbon





Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians



L. Lagier [a], F. Mouchet [a, *], C. Laplanche [a], A. Mottier [a], S. Cadarsi [a], L. Evariste [a], C. Sarrieu [b, c], P. Lonchambon [b, c], E. Pinelli [a], E. Flahaut [b, c], L. Gauthier [a]

[a] EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France
[b] Université de Toulouse, INP, UPS, Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), UMR CNRS 5085, F-31062, Toulouse Cedex 9, France
[c] CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062, Toulouse, France

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received 20 January 2017
Received in revised form
3 April 2017
Accepted 10 April 2017
Available online 18 April 2017

A B S T R A C T

The attractive properties of carbon-based nanoparticles such as graphene and its derivatives or carbon nanotubes lead to their use in many application fields, whether they are raw or functionalized, such as oxidized. These particles may finally contaminate the aquatic compartment, which is a major receptacle of pollutants. The study of their impact on aquatic organisms is thus essential. At the nano scale, recent studies have highlighted that specific surface area should be used as the most relevant descriptor of toxicity instead of the conventional mass concentration. By using a dose-response model, this work compares the chronic toxicity observed on *Xenopus laevis* larvae after 12-day *in vivo* exposure to raw, oxidized carbon allotropes, or in the presence of chemical dispersant. We show that chemical dispersion does not influence the observed chronic toxicity, whether it is through surface chemistry (oxidation state) or through the addition of a dispersant. The biological hypothesis leading to growth inhibition are discussed. Finally, these results confirm that surface area is the more suited metric unit describing growth inhibition.

1. Introduction

Carbon-based nanoparticles (CNPs) such as graphene related materials (GRMs), carbon nanotubes (CNTs) and nanodiamonds (NDs) have outstanding properties making them attractive in an increasing number of applications [1–6]. Such properties are made possible by the nanometric scale of CNPs which allows them to behave differently from bulk materials of the same element. Each CNP is defined by its own unique characteristics including especially its specific surface area (SSA). It is known that the ratio between the number of atoms at the surface and in the bulk increases exponentially with decreasing particle size, making the surface reactivity more and more important [7,8]. This supposes that for a given mass, a CNP with a larger surface area should be more biologically reactive than a CNP with a smaller one. As non-soluble materials, the biological reactivity would be the interaction between the atoms located at the surface of the CNPs with the biological target. Thus, toxicity studies [7,9,10] which generally deal with aerial toxicity argue that the conventional expression of the concentration in terms of mass should be discouraged to predict the biological effects of CNPs in favor of surface area (in m^2 L^{-1}) which would be a more relevant dose metric describing these effects whatever the structure of the CNPs.

Our recent ecotoxicological study in amphibians [11] leads to the same conclusion: the effect of several allotropes of carbon on *Xenopus laevis* growth rate was investigated and the results clearly showed that surface area is the best descriptor of toxicity at high doses. However, only raw nanoparticles were considered in this previous work, whereas numerous commercial CNPs are most often functionalized (either covalently by oxidation, or non-covalently by addition of dispersants). Moreover, if they are released into the environment, CNPs could interact with natural organic matter and/or different chemical adsorbents, which can affect their dispersion state [12]. Most of *in vivo* studies generally report higher toxicity induced by such dispersed CNPs [13–17]. On the contrary, depending on the tested organism, others report a mitigate toxicity by testing such CNPs, like Li et al. [18] who suggest

* Corresponding author.
E-mail address: florence.mouchet@ensat.fr (F. Mouchet).

http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2017.04.016
0008-6223/

that organic matter coated on fullerene crystals could hinder their direct contact with cells.

To our knowledge, this study is the first to investigate if CNPs toxicity in water is defined by their surface chemistry (bare carbon atoms, oxygen groups, or adsorbed organic compounds) or only by their surface area itself. Modifying surface chemistry of CNPs is likely to influence their state of dispersion in the aqueous medium. The present work aims at investigating how different routes of dispersion in water: covalent (grafting of oxygen-containing functions) or non-covalent (adsorption of a chemical dispersant) may impact the potential chronic toxicity in amphibians. As an extension of our first study on the subject [11], this work also focuses on the same model organism, *Xenopus laevis*, as a well-known ecotoxicological model, especially for the evaluation of the CNPs toxicity [19,20]. Its physiology makes it particularly sensitive to the presence of contaminants in water [21], so that it is more and more used as monitoring system for water quality assessment [22]. Growth rate was investigated in larvae as a sensitive response that expresses the global health status of the living organisms. To keep continuity, the results concerning raw CNPs of our previous study [11] (double and multi-walled CNTs: DWCNTs and MWCNTs; few layer graphene: FLG; nanodiamonds: NDs) are reminded in this paper in order to provide an easier comparison between raw and dispersed counterparts. Covalent dispersion was investigated by exposing *Xenopus laevis* larvae to oxidized CNPs, namely oxidized DWCNTs (DW-ox) and graphene oxides (GO-A and GO-B), while in order to tackle more environmentally realistic conditions, non-covalent dispersion was tested *via* DWCNTs in the presence of commercial Suwannee River natural organic matter (SRNOM), and MWCNTs in the presence of carboxymethyl cellulose (CMC). This work is focusing on stable and non-soluble carbon nanoparticles in environmental conditions, thus excluding for example small-size fullerenes which are molecules and spontaneously oxidize in water to form soluble fullerol derivatives.

2. Experimental

2.1. Synthesis and characterization of the studied CNPs

DWCNTs were synthetized by catalytic chemical vapor deposition (CCVD) as already described by Flahaut et al. [23]. MWCNTs (Graphistrength batch 09215) were provided by Arkema France and described by Bourdiol et al. [24]. Oxidized DWCNTs (DW-ox) were prepared by oxidation of the initial raw DWCNTs by a treatment with 3 M HNO_3 at 130 °C (24 h) in reflux conditions. DW-ox were washed with deionized water by filtration on polypropylene membrane (0.45 μm pore size). Finally, DW-ox were freeze dried. GOs (batch A (xGO- 116) and B (nxGOH_37B), respectively GO-A and GO-B) were provided by Antolin Group and prepared by oxidation of GANF© (Grupo Antolin Carbon Nanofibers) using the Hummer's method [25,26].

Physico-chemical characteristics of the tested CNPs are detailed in Table 1. Elemental analysis was performed by CHNS organic elementary analysis. Specific surface area was measured using the Brunauer, Emett and Teller's method (BET) (N_2 adsorption) on powdered samples of CNPs.

Fig. 1 shows the difference of morphology between the tested CNPs. Compared to their raw counterparts [19,24,29], particles presented here appear less agglomerated and better dispersed.

2.2. Chemical dispersants

Commercial Suwannee River natural organic matter (SRNOM; Cat no. 1R101N) was purchased from the International Humic Substances Society (IHSS, St Paul, MN, USA) and was added to each DWCNT suspension at a 1:1 ratio. This ratio was found sufficient to stabilize the dispersion of each DWCNT concentration. SRNOM is a natural mixture of humic substances, initially provided at 8.5% (w/w) of humidity, with a high content in organic matter, and a low amount of salts as described in Verneuil et al. [30,31]. Elemental analysis gives a composition of 52.47% of carbon, 42.69% of oxygen, 4.19% of hydrogen, 1.1% of nitrogen, 0.65% of sulfur and 0.02% of phosphorus (w/w).

Carboxymethyl cellulose (CMC) ($C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$, Fluka) is a water-soluble, anionic polymer which is massively used in food industry as additive (E466), and also in cosmetics and pharmaceuticals, as described in Bourdiol et al. [24]. Here, each suspension of MWCNTs was prepared with addition of CMC at 50 $mg.L^{-1}$, because the effectiveness of dispersion by using CMC was found optimal at this concentration [24].

Both SRNOM and CMC are found non-toxic towards *Xenopus* larvae.

2.3. CNP physical dispersion and contamination of the exposure media

The desired amount of CNP powder was first weighed and dispersed in deionized water (together with a chemical dispersant or not) to obtain a stock suspension. The latter was homogenized (except for GOs which is already rather hydrophilic, and in order not to decrease its size) by physical dispersion using appropriate mechanical methods such as shear mixing with a homogenizer (SILVERSON L5M) at 8000 rpm followed by a pulsed sonication of 30 min (Vibra-cell 75042 -500 W – 3s on/3s off) with a probe of 1 cm diameter at 30% amplitude.

Then, depending on the target concentration, required amounts of this stock suspension were sampled under ultrasonic bath before being introduced in individual glass test tubes and adjusted to 20 mL by addition of deionized water. For each concentration, 12 test tubes of 20 mL were thus prepared, corresponding to the number of exposure days.

Afterwards, just prior to contamination of the water column, the 20 mL suspensions of CNPs were dispersed 2 min in an ultrasonic bath (Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 kHz). Finally, they were poured in crystallizing dishes and the test tubes were rinsed twice with reconstituted water (RW) to collect remaining CNPs on the tubes walls. Crystallizing dishes were finally leveled to 2L with RW before introducing the organisms.

2.4. Xenopus rearing and breeding

Spawning of *Xenopus* was induced by injection of 50 IU of pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG 500; Intervet, France, [9002-70-4]) in males and of 750 IU of human chorionic gonadotropin (HCG; Organon, France, [9002-61-3]) in females. Viable eggs were bred at 22 ± 2 °C in normal tap water filtered through active charcoal. As soon they got self-feeder, larvae were fed with dehydrated aquarium fish food (Tetraphyll®). They could both feed directly in the water column where they lived, as they are filter-feeders, but they also mainly grazed settled food at the bottom of the containers. Larvae were bred in this way until they reached an adequate development stage for experimentations.

2.5. Exposure conditions

Xenopus larvae at stage 50 according to the development table of Nieuwkoop & Faber [32] were exposed 12 days in semi-static conditions based on the international standard 21427-1 [33]. The animals were submitted to a natural light-dark cycle at 22 ± 0.5 °C and fed every day with fish food TetraPhyll®. Water used for the

Table 1
Physico-chemical characteristics of the carbon-based nanoparticles. SWCNTs: single-walled CNTs; TWCNTs: triple-walled CNTs; wt.%: weight %; NA: not available.

	DW-ox	DW-SRNOM	MW-CMC	GO-A	GO-B
Synthesis/production	HNO_3 3 M at 130 °C during 24 h of raw DWCNTs	Catalytic chemical vapor deposition		GANF© processed by Hummer's method	
Catalyst in starting material	Co/Mo-MgO	Co/Mo-MgO	Fe-Al_2O_3	Ni, Fe, Co	
Carbon content	88.3 wt%	92.0 wt%	~92.0 wt%	45.2 wt%	48.0 wt%
Oxygen content	11.7 wt%	3.5 wt%	~1 wt%	51.3 wt%	48.2 wt%
Number of walls/layers (HRTEM)	80% DWCNTs, 15% SWCNTs, 5% TWCNTs	80% DWCNTs, 15% SWCNTs, 5% TWCNTs	5-15 (100% MWCNTs)	1-5 [27,28]	
Size (TEM)	1 to 100 μm length, 1–3 nm ø	1 to 100 μm length, 1–3 nm ø	0.1–10 μm length, 10–15 nm ø	0.2–8 μm	0.2–8 μm
Specific surface area (BET)	300 $m^2 g^{-1}$	980 $m^2 g^{-1}$	235 $m^2 g^{-1}$	228 $m^2 g^{-1}$	206 $m^2 g^{-1}$

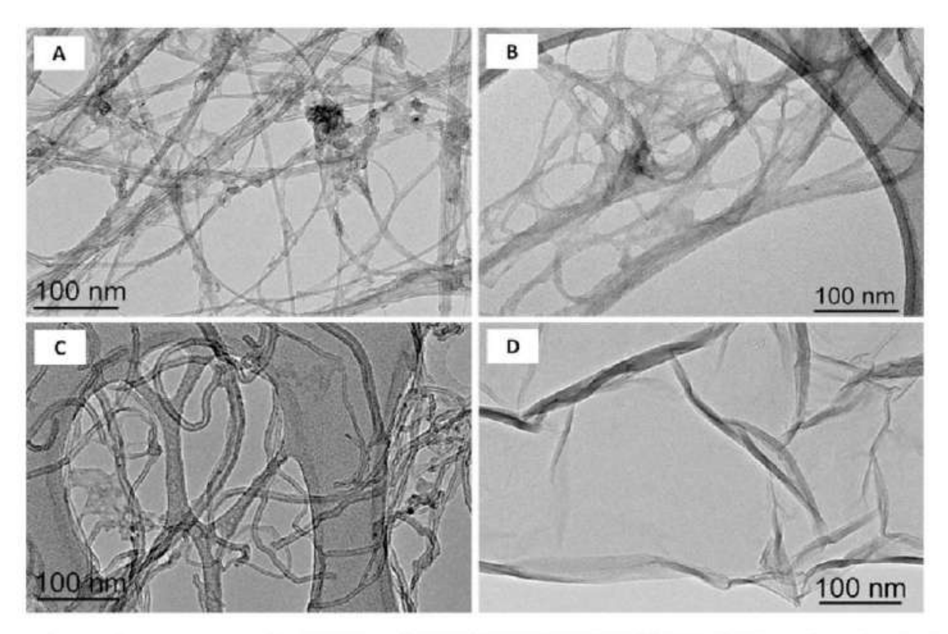


Fig. 1. Transmission electron microscopy micrographs of (A) DW-ox, (B) DW-SRNOM, (C) MW-CMC, (D) GO-A. GO-B is not shown here but is similar to GO-A.

experiment was reconstituted from distilled water added with nutritive salts: 294 mg L^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 123.25 mg L^{-1} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 64.75 mg L^{-1} $NaHCO_3$; 5.75 mg L^{-1} KCl. A concentration range from 0.05 to 50 mg L^{-1} of oxidized CNPs and raw CNPs in the presence of a dispersant was tested on *Xenopus*: DW-ox, GO-A, GO-B, DWCNTs with the addition of SRNOM (DW-SRNOM) and MWCNTs with the addition of CMC (MW-CMC). Larvae were grouped in batches of 20 animals in crystallizing dishes and exposed to CNPs in RW or in negative control (NC) media (RW alone). *Xenopus* were also exposed in RW to SRNOM and CMC alone (without CNPs). Whatever the condition, pH of the media was about 7 ± 1 in compliance with the international standard 21427-1 [33].

After 12 days of exposure, the size of larvae was measured. Larvae were dissected under binocular and macro observations of the intestines and the gills were performed.

2.6. Chronic toxicity and calculation models

The size of each larvae was measured at the beginning (d_0) and at the end (d_{12}) of the exposure using the ImageJ 1.49 software. In order to be compared, sizes were then normalized as described in our previous study [11] according to the following formula:

$$Normalized\ size\ (\%) = \left(\frac{Ld_{12} - MLd_0}{MLd_0} \times 100\right) \times \left(\frac{100}{MLCd_{12}}\right)$$

Ld_{12} is the length of one individual larva at 12 days, MLd_0 is the mean length of the group of the exposed larvae at day 0, and $MLCd_{12}$ is the mean length of the NC group at day 12.

Then, in order to express normalized size as a function of mass or surface concentration, the corresponding metrics for each dose to which larvae were exposed (Table 2) were investigated. Surface concentrations ($m^2\ L^{-1}$) were calculated as follows:

$$Surface\ concentration = \frac{SSA \times M}{1000}$$

Where *SSA* is the specific surface area ($m^2 . g^{-1}$) of a given CNP (see Table 1 for SSA values) and *M* is the mass (mg) of CNP used per liter of RW.

Thus, amphibian dose-response growth inhibition could be modeled by predicting the normalized size using the following two-parameter logistic equation as previously detailed [11]:

Table 2
Corresponding metrics for each dose (A-F) of carbon-based nanoparticles (CNPs) to which *X. laevis* larvae were exposed. NT: no tested.

CNPs	Mass concentration ($mg.L^{-1}$)						Surface concentration ($m^2.L^{-1}$)					
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
GO-A	NT	0.10	NT	1	10	50	NT	0.02	NT	0.23	2.28	11.4
GO-B	0.05	0.10	0.15	1	10	NT	0.01	0.02	0.03	0.21	2.06	NT
DW-ox	NT	0.10	NT	1	10	50	NT	0.03	NT	0.3	3	15
DW-SRNOM	NT	0.10	NT	1	10	NT	NT	0.10	NT	0.98	9.8	NT
MW-CMC	NT	0.10	NT	1	10	50	NT	0.02	NT	0.24	2.35	11.75

$$E\left(Normalized\ size_{ijk}\right) = \frac{100}{1+\left(\frac{x_{ijk}}{EC_{50,\ i}}\right)^{1/\alpha_i}}$$

where x_{ijk} is the dose and i, j, and k are the indices over dose metrics, CNPs, and concentrations, respectively. $EC_{50,i}$ is the value of dose metric i when the predicted size reaches 50%. At this point, the slope is $-25/EC_{50,i}\alpha_i$.

Sizes were measured with errors of different magnitudes (heteroscedasticity). Consequently, the data had to be fitted using nonlinear weighted least-squares regression. In order to find which dose metric is the best descriptor of growth rate, two models were compared, each using one of the dose metric as a predictor, and their performances were evaluated *via* their R^2 and Akaike information criterion (AIC). R^2 measures the proportion of the variance of the response variable which is "explained" by the model (higher R^2 are deemed better). R^2 values are easy to compute and are comparable between models and between studies even by using distinct datasets. R^2 as such, however, does not take into consideration heteroscedasticity, nor differences of model complexities, and the level of significance of R^2 differences is left to the user's opinion, which use is consequently limited in model selection [34]. AIC, on the other hand, is a trade-off between goodness-of-fit and complexity (lower AIC are deemed better) and fully takes into consideration measurement errors. Only the difference between two AIC values (AIC_A and AIC_B; $AIC_A > AIC_B$) which originates from two models (models A and B) which simulate the same response variable with the same data is relevant, and in that case the evidence ratio exp (AIC_A-AIC_B/2) indicates how much more likely model A is than model B [35]. Statistical computations were carried out with R 3.1.3 [36].

Finally, statistical differences of normalized growth rate between *X. laevis* larvae exposed to each dose of CNPs (from A to F) and the NC group were performed using Student's t-test. Normality requirement and homoscedasticity were fulfilled according to Shapiro-Wilk test and Fisher's test, respectively. Results are shown in Table 3.

3. Results

3.1. Chronic toxicity

No significant growth inhibition was observed in larvae exposed to CMC and SRNOM alone. Size of larvae exposed to CNPs decreased with increasing concentrations. A significant growth inhibition was observed in larvae exposed to GO-B, DW-SRNOM and MW-CMC from concentration E, and exposed to GO-A and DW-ox at the concentration F (Table 3).

Normalized size was plotted as a function of mass (Fig. 2 A) and surface area of CNPs (Fig. 2 B). The model using surface area presents an AIC of 3031.3, against 3009 for the model involving mass concentration, which corresponds to an important difference in spite of the order of magnitude of the values [35]. This statistical discard between these two AIC values represents the probability that the mass model is 69564 less probable than the surface area model. In the same way, goodness of fit was found better for the model using surface area ($R^2 = 0.87$) than for the model using mass concentration ($R^2 = 0.73$), indicating that surface area described better larvae growth than mass.

3.2. Macro-observations of dissected larvae

As evidenced in earlier studies on raw CNPs [19,20,37], the dissections revealed the presence of dark agglomerates in the digestive tract and in gills of larvae exposed to each CNP compared to the NC larvae (Fig. 3). These black masses correspond to CNP agglomerates and were more and more visible in the gut as the exposure concentration increased, whatever the tested nanoparticle. The same dose-dependent observations were made on the gills of the exposed larvae.

4. Discussion

The aim of this study is to assess the influence of carbon-based nanoparticles on growth inhibition of the model organism *Xenopus laevis*, a filter-feeder amphibian larva, combined with an original approach to determine the dose-response relation based on surface area, as the most relevant descriptor [11]. In the present study, a particular interest was assigned to analyze the effect of the dispersion state of different CNPs on larvae growth, dispersed or not by organic matter (non-covalent dispersion), or functionalized by oxidation (covalent dispersion) in order to obtain a good dispersion without any additive.

4.1. Metric doses

Data show that CNPs induce a dose-dependent growth inhibition after 12 days of exposure (Table 3). On the basis of the classical

Table 3
Growth in *X. laevis* larvae exposed to each dose (A-F) of carbon-based nanoparticles. Results are given as the normalized mean (%) ± Standard Error of the Mean (SEM). "*" significantly different size of larvae compared to the NC group for $p \leq 0.05$; "**" significantly different size of larvae compared to the NC group for $p \leq 0.01$; "***" significantly different size of larvae compared to the NC group for $p \leq 0.001$; NC: negative control; NT: no tested.

	NC	A	B	C	D	E	F
GO-A	100.00 ± 3.23	NT	100.20 ± 2.98	NT	100.29 ± 2.58	90.71 ± 2.6*	50.36 ± 3.16***
GO-B	100.00 ± 3.59	99.82 ± 5.37	97.52 ± 4.77	101.23 ± 3.87	97.46 ± 2.69	72.49 ± 4.48***	NT
DW-ox	100.00 ± 4.48	NT	106.27 ± 2.69	NT	95.67 ± 2.78	91.12 ± 2.62	49.08 ± 2.61***
DW-SRNOM	100.00 ± 3.62	NT	108.80 ± 3.88	NT	96.51 ± 2.45	61.35 ± 2.97***	NT
MW-CMC	100.00 ± 1.26	NT	94.24 ± 1.26**	NT	96.97 ± 1.63	86.12 ± 2.43***	31.66 ± 2.96***

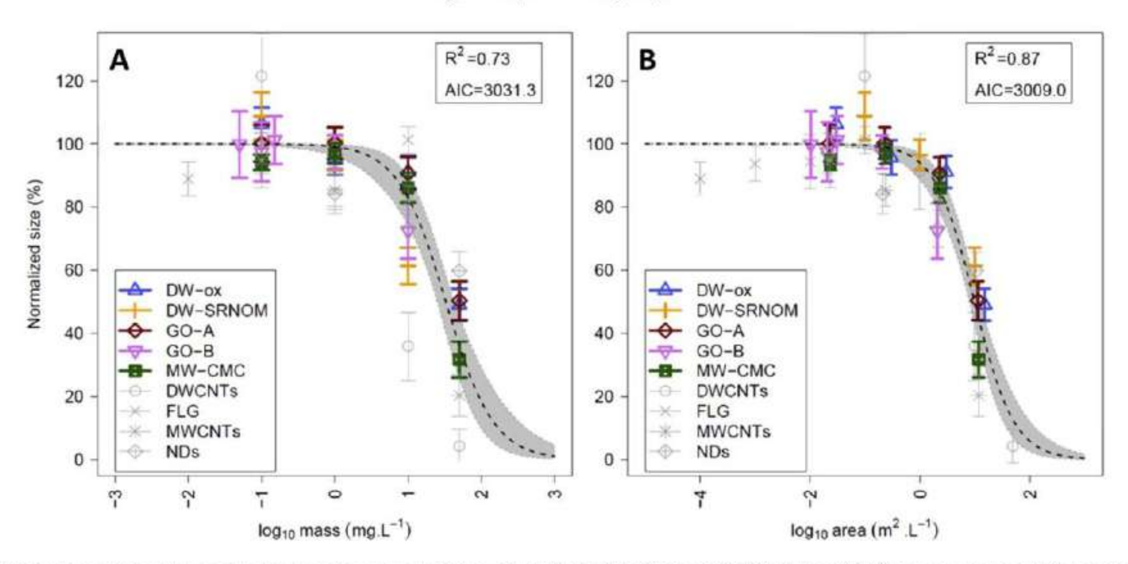


Fig. 2. Growth inhibition in *X. laevis* larvae after 12 days of exposure to DW-ox, GO-A, GO-B, DW-SRNOM and MW-CMC. Raw CNPs (few layer graphene, FLG; nanodiamonds, NDs; DWCNTs; MWCNTs) from previous study [11] are reminded in grey. Normalized size (%) is plotted *vs* the base-10 logarithms of two different metrics: mass concentration (mg.L^{-1}) (2.A) and surface area concentration (m^2 L^{-1}) (2.B). Black dashed lines represent nonlinear regression model predictions, and shaded areas are 95% confidence intervals (CIs) on these. The 95% CIs on the mean sizes, which were computed from the experimental assays, are represented as vertical error bars. (A colour version of this figure can be viewed online.)

mass concentration unit, GO-A could be considered as the least toxic CNP since it induces the lowest growth inhibition. Thus, the ascendant toxicity level of CNPs (including raw CNPs described by Mottier et al. [11]) could be ordered as follows: FLG (few layer graphene) > GO-A > DW-ox > NDs (nanodiamonds) > MW-CMC > GO-B > MWCNTs > DW-SRNOM > DWCNTs.

However, as CNPs behave differently from classical chemicals because of their physico-chemical characteristics, the classical approach based on mass concentration could lead to mis-interpretations. Thus, some authors proposed to use the surface area unit as a better descriptor of the CNP biological effects [7,9–11] than mass concentration. In order to determine if this new approach was relevant to describe the growth inhibition induced by the tested CNPs, in our experimental conditions, normalized sizes of larvae were plotted as a function of the two units. Fig. 2 shows a comparison between growth inhibition of *Xenopus laevis* larvae expressed *vs* mass concentration (Fig. 2 A) or surface area concentration (Fig. 2 B).

The quality of models involving the two dose metrics was compared using the AIC values (Fig. 2). This statistical discard between these two AIC values represents the probability that the mass model is 69564 less probable than the surface area model. This statistical approach demonstrates that growth inhibition mechanisms were most dependent on the surface area of the CNPs than on their mass.

In the same way, goodness of fit was found better for the model using surface area than for the model using mass concentration (Fig. 2). In compliance with the corresponding coefficient of determination of our previous work (R^2 = 0.88 for the surface model) [11], our value (R^2 = 0.87) demonstrates the good ability of the logistic equation to describe the process generating the data. The similarity between the R^2 values related to surface model from our first study based on raw CNPs only [11] and our present results relative to dispersed CNPs suggests that CNP surface area is adequate to predict *Xenopus* growth rate in both cases, irrespectively of CNP allotropic form (1D for nanotubes and 2D for graphenes) or their state of dispersion and oxidation level. Moreover, the global surface concentration for which 50% of growth inhibition was observed (EC_{50}) was estimated to be 9.85 m^2. L^{-1}. This value is in agreement with our previous work where EC_{50} was found just slightly lower (7.47 m^2. L^{-1}) [11]. These results confirm that CNPs are responsible for growth inhibition mechanisms related to their surface area, regardless of their other physico-chemical properties. To give a correspondence with an EC_{50} based on mass concentration, this would correspond to values from 10 mg L^{-1} for DWCNTs/DW-SRNOM (which have a high SSA) to 985 mg L^{-1} for the raw FLG described previously [11] (which has a low SSA).

4.2. State of dispersion

In the present study, the results of the model demonstrate that larvae growth appeared to be ruled by CNP surface area, as if their state of dispersion could be neglected. This conclusion contrasts with the literature which generally reports, on the basis of mass concentration and depending on organisms and exposure circumstances, higher [16,17,38] or lower [18] toxic effects for dispersed CNPs compared to their raw counterparts.

In this work, two allotropic forms of carbon and two modes of dispersion are used: non-covalent dispersion with natural organic matter or carboxymethyl cellulose, and covalent dispersion by functionalization (oxidation). Note that other parameters that could influence the stability of CNP dispersions (pH and salt concentration of the medium [39]) were constant. Whatever the mode of dispersion used, functionalized (covalently or not) CNPs are better dispersed in water than raw CNPs [40,41]. Indeed, carbon surfaces tend to be attracted by each other because of van der Waal's forces [42]. In absence of organic matter, raw CNPs tends to rapidly agglomerate and settle down. The example of raw MWCNT dispersion observed in Fig. 4 A highlights this heterogeneous aspect of the dispersion at the beginning of each medium renewal (every 24 h).

In the presence of organic matter (SRNOM or CMC), CNPs form non-covalent bonds with the dispersant which allow to maintain their individual dispersion in the water column [43]. The fulvic and humic acids of the natural organic matter could thus be adsorbed

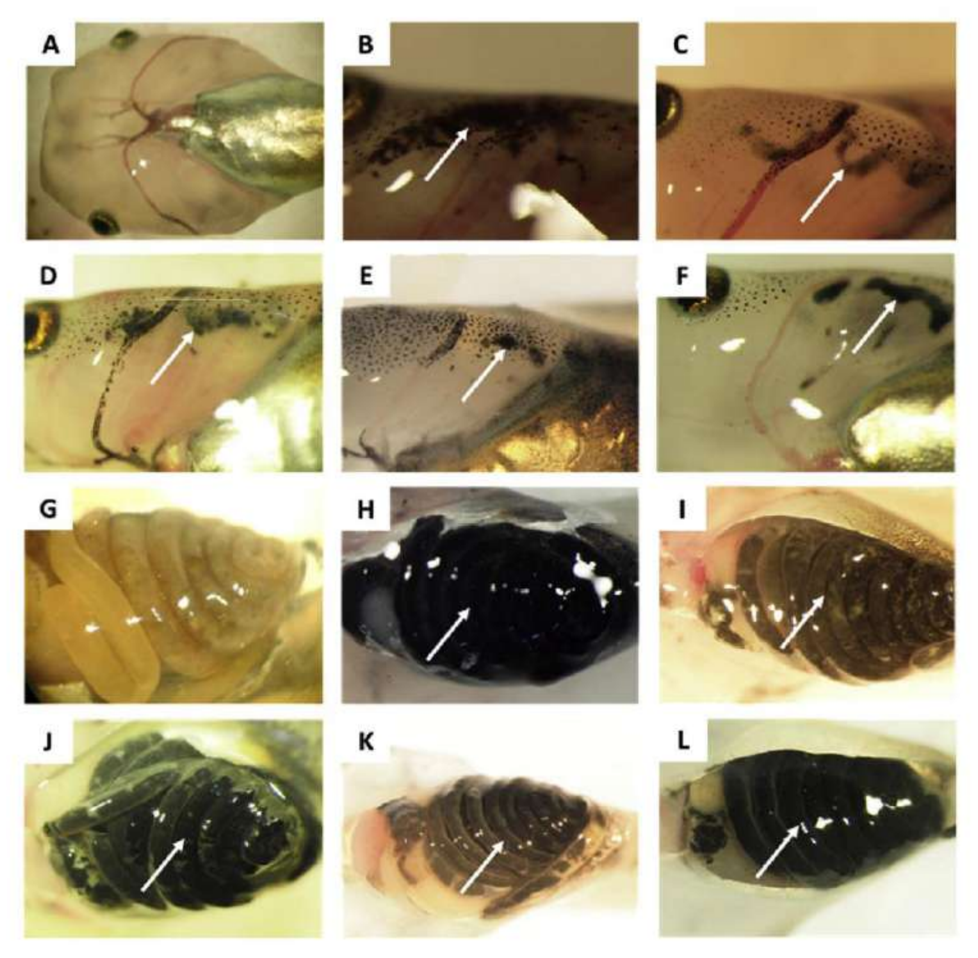


Fig. 3. Macro-observations under binocular of *X. laevis* larvae exposed during 12 days to 10 mg L^{-1} of (C, I) DW-SRNOM and (F, L) GO-B, and 50 mg L^{-1} of (B, H) MW-CMC, (D, J) DW-ox, (E, K) GO-A compared to (A, G) the NC group. CNP agglomerates (indicated by white arrows) were strongly evidenced in the gills (B, C, D, E and F) and in the intestines (H, I, J, K and L) of larvae exposed to each CNP in contrast to the NC group (A, G). (A colour version of this figure can be viewed online.)

on the surface of the CNPs by complex interaction mechanisms, including electrostatic, hydrophobic, π-π and hydrogen-bond interactions [44]. SRNOM and CMC could so coat the surface of CNPs and act as surfactants to counterbalance van der Waals attractions by inducing electrostatic or steric repulsions: this balance of repulsive and attractive forces leads to a thermodynamically stable dispersion [42]. More generally, the presence of biomacromolecules adsorbed on CNTs was demonstrated to significantly delay their agglomeration rate, which can be attributed to steric repulsion [12]. For example, macro-observations of exposure media show that dispersion of DWCNTs in presence of SRNOM (DW-SRNOM) was more stable in the water column than raw CNTs (Fig. 4 A, B). The same results were observed when MWCNTs were dispersed in the presence of CMC [24]. Despite CNP surface is supposed to be covered by organic compounds in the exposure media [40], the dispersed CNPs still fit with the model using surface area, which shows that the presence of organic matter does not influence larvae growth inhibition (also evidenced with the corresponding control experiments).

Another type of chemical dispersion is finally obtained by functionalizing CNPs, leading to the change of their surface chemistry. Thus, hydrophobic raw CNPs could be transformed by various chemical processes in order to form more hydrophilic functions linked by covalent bonds to the surface of the CNPs. In the case of DW-ox [45], GO-A and GO-B (unpublished data), these functional groups are oxygen-based (epoxide, hydroxyl, carboxyl). Hydrophilization of CNTs through oxidation was proved both to prevent them from agglomeration and to enhance their dispersion stability in aqueous media [15]. Similarly, colloidal stability provided by carboxyl groups on the periphery of graphene oxide was reported by Park et al. [46], while basal surfaces of GO include both polar hydroxyl, epoxide groups, and unmodified hydrophobic graphenic domains which can make it acting like a surfactant [47]. According to visual observations, suspensions of oxidized CNPs such as GO-B (Fig. 4 C), GO-A and DW-ox (data not shown) clearly appears more homogeneous in water compared to raw ones. This increased stability could also be explained by a stronger interaction with different components of the media originating from RW (nutrient salts) or food (trace elements, hydrophilic vitamins and other organic compounds). For example, raw CNTs with very few oxygen-containing functional groups were demonstrated to have relatively low sorption capabilities for metal ions [48], whereas their oxidized counterparts exhibit generally higher ones because of their negative charges on which cations can complex with [15,49].

Surfaces coated with organic matter or oxidized surfaces significantly modify physical adsorption and catalytic capabilities of nanomaterials. This is particularly important in regard to

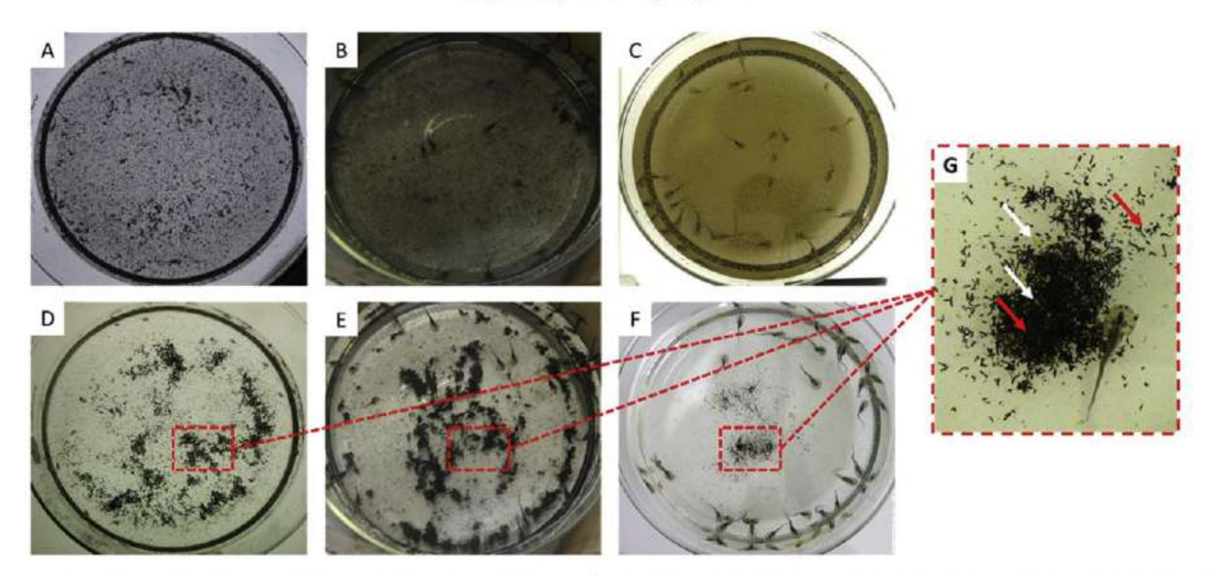


Fig. 4. Visual aspect of the medium of exposure of *X. laevis* larvae exposed to 10 mg L^{-1} of raw MWCNTs (A, D), DW-SRNOM (B, E), and GO-B (C, F). Each CNP exhibits a different state of dispersion more or less homogeneous immediately after renewal (A, B, C) depending on the addition of a chemical dispersant or its oxidation state. Raw MWCNTs appear to be the most heterogeneous as highlighted by the presence of agglomerates (A). For each CNP, the state of dispersion is different between T0h (just after contamination; A, B, C) and T24h (24 h after contamination; D, E, F). In spite of different initial states of dispersion depending on the type of CNPs, the final aspect is rather similar after sedimentation, where a mixture of feces, CNPs (white arrows) and food (red arrows) can be observed (G). (A colour version of this figure can be viewed online.)

biological response [14]. Moreover, depending on the state of dispersion of each CNP (Fig. 4 A, B, and C), their bioavailability for *Xenopus laevis* is modified. As they are pelagic, larvae were more exposed to dispersed CNPs in the water column than raw CNPs. Nevertheless, expressed as a function of CNP surface area, the measured growth endpoint shows no difference between larvae exposed to dispersed and undispersed CNPs. Only CNP surface area appears to describe the observed effects (Fig. 2).

X. laevis larvae are able to feed by both filtration and grazing [50]. This particularity makes it indifferent to the dispersion state of CNPs since it will be exposed by both ways. So, whatever the kind of CNPs and their state of dispersion, they are transferred *via* the general cavity to basket gills and the digestive tract of larvae (Fig. 3) and finally excreted (Fig. 5. B) [37]. In our exposure conditions, *Xenopus* larvae ingest their feces and suspended matter continuously over the 24 h of the medium renewal, leading to a kind of sediment composed of a mixture of agglomerated CNPs and organic matter in the crystallizing dishes. Consequently, whatever the initial state of dispersion and the type of CNPs, the observations of the exposure media after 24 h are rather similar (Fig. 4 D, E, F, and G).

4.3. Biological hypothesis

As filter-feeder organisms, *Xenopus* larvae actively filter the water column containing particles in suspension and ions from RW and food which will be found in basket gills, oral, pharyngeal cavity and intestinal tract. Thus, it appears that regardless of their oxidation state or their load of organic matter, but depending on their surface area, CNPs could lead to larvae growth inhibition.

Growth inhibition (Table 3; Fig. 2) could be explained by several non-exclusive hypotheses. Firstly, as shown in Fig. 3, CNP agglomerates were largely observed in the intestinal tract, with no significant difference whatever the CNPs and the mode of dispersion used. An interaction between nutrients and CNPs could be responsible for a decrease in nutrients absorption all along the digestive tract. Indeed, it has been demonstrated that the hydrophobic surfaces of CNPs could adsorb solutes with a molecular structure presenting hydrophobicity, planarity/sp^2 hybridization for π-π interactions, and positive charge (which is opposite to that of most of carbon surfaces) [51]. CNP adsorption capacity was exhibited to increase with a larger surface area [15]. In addition, CNPs shown no significant change in their physico-chemical properties towards physiological acidic conditions as described for the human digestive tract [52], whom gastric fluid is more acid ($pH = 2.9$) [53] than *Xenopus* tadpole one ($pH = 7.8$) [54]. The presence of CNPs in the digestive tract could thus lead to a sequestration of essential micronutrients such as amino-acids, vitamins [51], but also nucleic acids and other hydrophobic macromolecules [14]. These associations may reduce the nutrient intake and their bioavailability in the larvae. In addition, it should be noticed that CNPs are assumed not to pass through the intestinal barrier, as previously assessed for CNTs in *Xenopus* [19] and similarly shown for MWCNTs in *Daphnia* [17], GO derivatives in the mouse [55] and bare fluorescent NDs in worms [56]. This could be explained because CNPs form aggregates inside the intestinal lumen (Fig. 3 H-L) that are too large to enter the cells. In addition, CNPs may not be recognized and taken up by the active transport system of the intestinal cells. However, although experimental data is missing, the molecular dynamics simulations proposed by Titov et al. [57] suggest that GRMs could form stable hybrids with biological lipid bilayers (where they would be passively localized in the hydrophobic core). It could be hypothesized that such a configuration with the intestinal cell could form a potential, partial, physical barrier limiting nutrients intake of the larvae. Finally, the presence of CNPs in the digestive tract could lead to a partial starvation in *Xenopus*, increasing with their surface area. Starvation is the main reason that could explain the observed growth inhibition in *Xenopus laevis* [58], and such an effect could be a consequence of metabolic priorities as suggested by Sumpter et al. [59] and Guderley et al. [60] in the fish.

Secondly, Fig. 3 reveals the macro-presence of CNP agglomerates inside the gills. Like intestine, gills represent a large surface of exchange, so it also appears more logical to consider the surface of CNPs rather than their mass concerning their interaction with gills. In *Xenopus laevis* larvae, gills are well vascularized for gas exchange but they also have a function of food entrapment [61]. Our

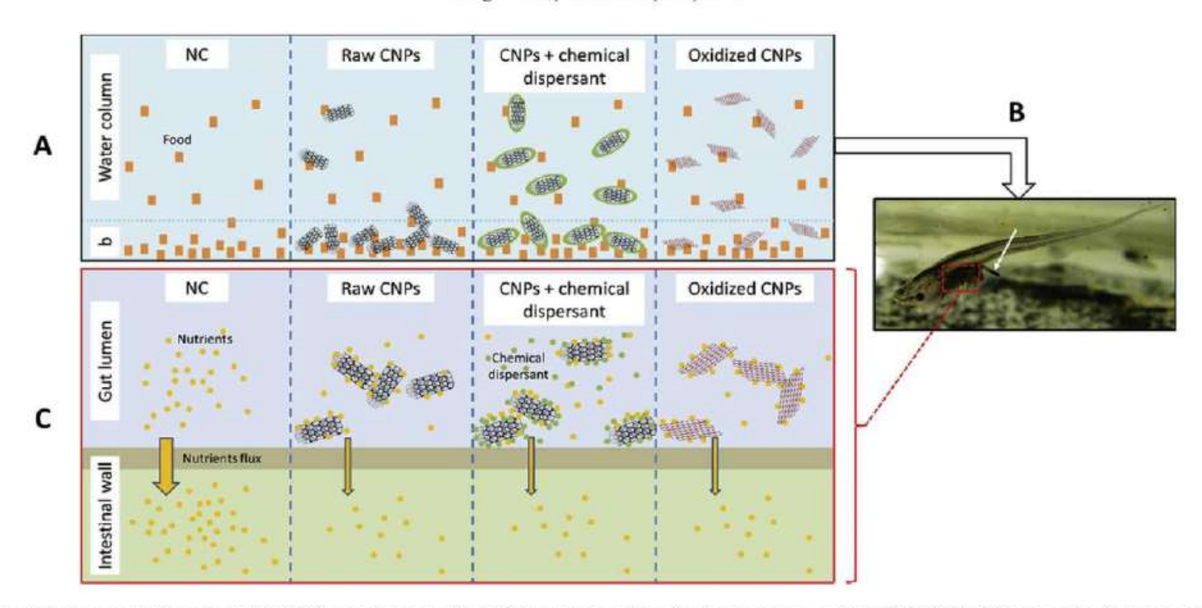


Fig. 5. Theoretical representation of growth inhibition mechanisms of *X. laevis* larvae by ingestion of carbon based nanoparticles (CNPs). 5.A: different modes of exposure of *X. laevis* larvae to a given dose of CNPs compared to the negative control (NC) group; b: bottom of the container. 5.B: photography of a *Xenopus* larva in the water column exposed to CNPs. Whatever the state of dispersion and the type of CNPs, these latest are excreted as represented by the white arrow. 5.C: theoretical representation of the decrease of absorption of nutrients in the intestine (as shown by the thickness of the orange arrows). In spite of different states of dispersion depending on the CNP type, ingested CNPs limit the absorption of nutrients in the same way, depending on their surface area (5.C). (A colour version of this figure can be viewed online.)

observations suggest a gill injury which could be at the origin of both decreased efficiency of food intake and a respiratory disturbance. In presence of MWCNTs, modifications in gaseous exchanges were evidenced [62]. Smith et al. [63] reported similar results in rainbow trout exposed to single-walled CNTs with a dose-dependent increase in ventilation rate. Eventual gill clogging may also force *Xenopus* larvae to move to the surface to breath thanks to their lungs [61]. This aerial breathing represents an energetic cost which could finally affect the larval growth. A possible disruption of cutaneous respiration by CNPs coating the skin could be possible and should not be underestimated since skin accounts for the predominant route of O_2 uptake in air-breathing tadpoles [64].

Finally, an important mechanism underlying CNP toxicity is the induction of oxidative stress because of direct or indirect generation of reactive oxygen species (ROS) [14]. Oxidative stress could be the results of many processes including starvation [65] and gills clogging at the origin of the modification of the red-ox status of gills cells [66]. Among critical determinants that can affect ROS generation, Fu et al. [13] identified that nanoparticles with higher specific surface areas could lead to an increased production of ROS compared to their bulk-size counterparts. This induction of ROS has been observed in many organisms and tissues exposed to different allotropic forms of carbon [66–68]. In living organisms, cellular homeostasis involves a balance between ROS generation and ROS elimination by antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, or glutathione peroxidase. Induction of defense systems against oxidative stress could represent an energetic cost leading to a lower amount of energy available for *Xenopus* larvae growth.

5. Conclusion

The toxicity of different types of CNPs on *Xenopus laevis* larvae growth rate was expressed as a function of two dose metrics: mass or surface concentration. The statistical comparison between the two models clearly shows that CNP surface area is the most relevant metric that could describe the effect of CNPs on larvae growth. Growth appears similarly impacted whatever the allotropic form of CNPs or their dispersion state, including covalent (oxidized CNPs) and non-covalent dispersions (raw CNPs added with a chemical dispersant). This suggests that growth inhibition mechanisms are mostly dependent on the specific surface area of each CNP. Such growth inhibition could be explained by the trophic behavior of larvae, which are both filter-feeder and grazer: they could entrap CNPs both in water column when there are dispersed, or at the bottom if they have settled down. Once ingested, CNPs are assumed to adsorb nutrients (proportionally to their surface area) and not to pass through the intestinal barrier, leading to a decrease in nutrients absorption required for growth. A minor point is that CNPs could be responsible for respiratory disturbance by clogging the gills, forcing larvae to compensate by aerial breathing which represents an energetic cost.

In agreement with our previous work [11] related to raw CNPs only, this conclusion could so extend to a larger range of CNPs, including more environmentally realistic conditions of dispersion. Thus, specific surface area of most of the carbon-based nanoparticles likely to be found in the environment such as carbon nanotubes, few layer graphene, graphene oxide and nanodiamonds could thus be used for risk assessment by predicting their potential effect on the environment. More work is currently in progress with other nanocarbon species, such as for example reduced graphene oxide, aiming at extending this conclusion to "nanocarbons" in general.

Although literature generally reports higher toxicity for the dispersed CNPs, this is not the case in our study. However, only chronic toxicity dealing with growth inhibition was investigated in this work. No mortality was observed either, but other endpoints like genotoxicity would deserve further attention. In addition, our conclusion requires to be emphasized by new similar studies before being generalized to all CNPs. The same applies for other engineered nanoparticles (like metals and oxides) which would benefit from deeper analysis to know if they follow the same pattern or not. Furthermore, our model organism *X. laevis* is representative of anuran amphibian species at larval stage, whereas organisms with other feeding behavior would probably not have suffered from the

same growth inhibition. Other organisms should thereby be tested to know if this conclusion is proper to grazer, filter-feeders or can be generalized to a larger extent.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgements

This research was supported by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research. The research has also received funding from the European Union Seventh Framework Programme under grant agreement n°604391 Graphene flagship.

Thanks to L. Verneuil for his preparation of DW-SRNOM for the transmission electron microscopy.

References

[1] M.S. Mauter, M. Elimelech, Environmental applications of carbon-based nanomaterials, Environ. Sci. Technol. 42 (16) (2008) 5843–5859.
[2] Q. Wang, B. Arash, A review on applications of carbon nanotubes and graphenes as nano-resonator sensors, Comput. Mater. Sci. 82 (2014) 350–360.
[3] B. Zhang, Y. Wang, G. Zhai, Biomedical applications of the graphene-based materials, Mater. Sci. Eng. C 61 (2016) 953–964.
[4] C. Zhu, D. Du, Y. Lin, Graphene-like 2D nanomaterial-based biointerfaces for biosensing applications, Biosens. Bioelectron. 89 (2017) 43–55.
[5] M. Zhou, Z. Wang, X. Wang, Carbon Nanotubes for Sensing Applications, Elsevier Inc., 2017.
[6] D. Gon Lim, R. Ena Prim, K. Hyun Kim, E. Kang, K. Park, S. Hoon Jeong, Combinatorial nanodiamond in pharmaceutical and biomedical applications, Int. J. Pharm. 514 (2016) 41–51.
[7] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, Environ. Health Perspect. 113 (7) (2005) 823–839.
[8] M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G.V. Lowry, J.-P. Jolivet, M.R. Wiesner, Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, Nat. Nanotechnol. 4 (10) (2009) 634–641.
[9] M. Hull, A.J. Kennedy, C. Detzel, P. Vikesland, M.A. Chappell, Moving beyond mass: the unmet need to consider dose metrics in environmental nanotoxicology studies, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 10881–10882.
[10] T. Stoeger, C. Reinhard, S. Takenaka, A. Schroeppel, E. Karg, B. Ritter, et al., Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice, Environ. Health Perspect. 114 (3) (2006) 328–333.
[11] A. Mottier, F. Mouchet, C. Laplanche, S. Cadarsi, L. Lagier, J.-C. Arnault, et al., Surface area of carbon nanoparticles: a dose metric for a more realistic ecotoxicological assessment, Nano Lett. 16 (2016) 3514–3518.
[12] N.B. Saleh, L.D. Pfefferle, M. Elimelech, Influence of biomacromolecules and humic acid on the aggregation kinetics of single-walled carbon nanotubes, Environ. Sci. Technol. 44 (7) (2010) 2412–2418.
[13] P.P. Fu, Q. Xia, H. Hwang, P.C. Ray, H. Yu, Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species, J. Food Drug Anal. 22 (2014) 64–75.
[14] V.C. Sanchez, A. Jachak, R.H. Hurt, A.B. Kane, Biological interactions of graphene-family nanomaterials : an interdisciplinary review, Chem. Res. Toxicol. 25 (2012) 15–34.
[15] S. Boncel, J. Kyzioł-Komosińska, I. Krzyżewska, J. Czupioł, Interactions of carbon nanotubes with aqueous/aquatic media containing organic/inorganic contaminants and selected organisms of aquatic ecosystems – a review, Chemosphere 136 (2015) 211–221.
[16] E.J. Petersen, R.A. Pinto, D.J. Mai, P.F. Landrum, W.J. Weber Jr., Influence of polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to Daphnia magna, Environ. Sci. Technol. 45 (3) (2011) 1133–1138.
[17] A.J. Edgington, A.P. Roberts, L.M. Taylor, M.M. Alloy, J. Reppert, A.M. Rao, et al., The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes, Environ. Toxicol. Chem. 29 (11) (2010) 2511–2518.
[18] D. Li, D.Y. Lyon, Q. Li, P.J.J. Alvarez, Effect of soil sorption and aquatic natural organic matter on the antibacterial activity of a fullerene water suspension, Environ. Toxicol. Chem. 27 (9) (2008) 1888–1894.
[19] F. Mouchet, P. Landois, P. Puech, E. Pinelli, E. Flahaut, L. Gauthier, Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes, Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 5 (6) (2010) 963–974.
[20] F. Mouchet, P. Landois, E. Sarremejean, G. Bernard, P. Puech, E. Pinelli, et al., Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis, Aquat. Toxicol. 87 (2008) 127–137.
[21] L. Gauthier, "The amphibian micronucleus test, a model for in vivo monitoring of genotoxic aquatic pollution," *Alytes*, Int. J. Batrachol. 14 (2) (1996) 53–84.
[22] L. Gauthier, E. Tardy, F. Mouchet, J. Marty, Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian Xenopus laevis, Sci. Total Environ. 323 (2004) 47–61.
[23] E. Flahaut, R. Bacsa, A. Peigney, C. Laurent, Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes, Chem. Commun. R. Soc. Chem. (2003) 1442–1443.
[24] F. Bourdiol, F. Mouchet, A. Perrault, I. Fourquaux, L. Datas, C. Gancet, et al., Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae, Carbon N. Y. 54 (2013) 175–191.
[25] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of graphitic oxide, J. Am Chem. Soc 80 (6) (1958) 1339.
[26] B. Lobato, C. Merino, V. Barranco, T.A. Centeno, Large-scale conversion of helical-ribbon carbon nanofibers to a variety of graphene-related materials, RSC Adv. 6 (2016) 57514–57520.
[27] L. Tabet, C. Bussy, N. Amara, A. Setyan, A. Grodet, M.J. Rossi, et al., Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells, J. Toxicol. Environ. Health. A 72 (2009) 60–73.
[28] Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (Anses), Avis relatif à « l'évaluation des risques liés au GRAPHISTRENGTH C100 réalisée dans le cadre du programme Genesis »; Saisine n° 2007-SA-0417, 2011.
[29] V. Leon, A.M. Rodriguez, P. Prieto, M. Prato, E. Vazquez, Exfoliation of graphite with triazine derivatives under ball-milling conditions: preparation of few-layer graphene via selective noncovalent interactions, ACS Nano 8 (1) (2014) 563–571.
[30] L. Verneuil, J. Silvestre, F. Mouchet, E. Flahaut, J.-C. Boutonnet, F. Bourdiol, et al., Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea: "A sticky story", Nanotoxicology 9 (2) (2015) 219–229.
[31] L. Verneuil, Toxicité environnementale et écotoxicité de nanotubes de carbone chez des diatomées benthiques : de la cellule au biofilm, Université Paul Sabatier, France, 2015. PhD thesis.
[32] P.D. Nieuwkoop, J. Faber, Normal Tables of Xenopus laevis (Daudin), North-Holland, Amsterdam, 1956.
[33] ISO/FDIS 21427-1. Water Quality-evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei-part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae, International Organization for Standardization, Geneva, 2006.
[34] A.D.R. McQuarrie, C.-L. Tsai, Regression and Time Series Model Selection, World Scie, World Scientific Publishing Co. Re. Ltd, 1998. P 0 Box 128, Farrer Road, Singapore 912805 USA ofjice: Suite IB, 1060 Main Street, River Edge, NJ 07661 UK ofice: 57 Shelton Street, Covent Garden, London WC2H 9HE Regression.
[35] K.P. Burnham, D.R. Anderson, Model Selection and Multimodel Inference: a Practical Information-theoretic Approach, 2002. Second edi.
[36] R. Core Team, R: a Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.
[37] L. Muzi, F. Mouchet, S. Cadarsi, I. Janowska, J. Russier, C. Ménard-Moyon, et al., Examining the impact of multi-layer graphene using cellular and amphibian models, 2D Mater. 3 (2) (2016) 1–10.
[38] J. Cheng, C. Man Chan, L.M. Veca, W. Lin Poon, P. Kwok Chan, L. Qu, et al., Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (Danio rerio), Toxicol. Appl. Pharmacol. 235 (2009) 216–225.
[39] E. Heister, C. Lamprecht, V. Neves, C. Tîlmaciu, L. Datas, E. Flahaut, et al., Higher dispersion efficacy of functionalized carbon nanotubes in chemical and biological environments, ACS Nano 4 (5) (2010) 2615–2626.
[40] R. Grillo, A.H. Rosa, L.F. Fraceto, Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art, Chemosphere 119 (2015) 608–619.
[41] B. Smith, K. Wepasnick, K.E. Schrote, H. Cho, W.P. Ball, D.H. Fairbrother, Influence of surface oxides on the colloidal stability of multi-walled carbon nanotubes: a structure-property relationship, Langmuir Artic. 25 (17) (2009) 9767–9776.
[42] J. Hilding, E.A. Grulke, Z. George Zhang, F. Lockwood, Dispersion of carbon nanotubes in liquids, J. Dispers. Sci. Technol. 24 (1) (2003) 1–41.
[43] J. Gigault, B. Grassl, G. Lespes, Size characterization of the associations between carbon nanotubes and humic acids in aqueous media by asymmetrical flow field-flow fractionation combined with multi-angle light scattering, Chemosphere 86 (2012) 177–182.
[44] K. Yang, B. Xing, Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water, Environ. Pollut. 157 (2009) 1095–1100.
[45] T. Bortolamiol, P. Lukanov, A. Galibert, B. Soula, P. Lonchambon, L. Datas, et al., Double-walled carbon nanotubes : quantitative purification assessment, balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening, Carbon N. Y. 78 (2014) 79–90.
[46] S. Park, J. An, I. Jung, R.D. Piner, S. Jin An, X. Li, et al., Colloidal suspensions of highly reduced graphene oxide in a wide variety of organic solvents, Nano Lett. 9 (4) (2009) 1593–1597.
[47] L.J. Cote, J. Kim, V.C. Tung, J. Luo, F. Kim, J. Huang, Graphene oxide as surfactant sheets, Pure Appl. Chem. 83 (1) (2011) 95–110.
[48] X. Tian, T. Li, K. Yang, Y. Xu, H. Lu, D. Lin, Effect of humic acids on the

physicochemical property and Cd(II) sorption of multiwalled carbon nanotubes, Chemosphere 89 (2012) 1316–1322.
[49] H.-H. Cho, K. Wepasnick, B.A. Smith, F.K. Bangash, D.H. Fairbrother, W.P. Ball, Sorption of aqueous Zn[II] and Cd[II] by multiwall carbon nanotubes: the relative roles of oxygen-containing functional groups and graphenic carbon, Langmuir 26 (2) (2010) 967–981.
[50] D.B. Seale, K. Hoff, R. Wassersug, Xenopus laevis larvae (Amphibia, Anura) as model suspension feeders, Hydrobiologia 87 (1982) 161–169.
[51] L. Guo, A. Von Dem Bussche, M. Buechner, A. Yan, A.B. Kane, R.H. Hurt, Adsorption of essential micronutrients by carbon nanotubes and the implications for nanotoxicity testing, Small 4 (6) (2008) 721–727.
[52] M. Kucki, P. Rupper, C. Sarrieu, M. Melucci, E. Treossi, A. Schwarz, et al., Interaction of graphene-related materials with human intestinal cells: an in vitro approach, Nanoscale 8 (2016) 8749–8760.
[53] D.E. Beasley, A.M. Koltz, J.E. Lambert, N. Fierer, R.R. Dunn, The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome, PLoS One 10 (7) (2015) 1–12.
[54] I. Griffiths, The form and function of the fore-gut in anuran larvae (amphibia, salientia) with particular reference to the manicotto glandulare, J. Zool. 137 (2) (1961) 249–283.
[55] K. Yang, H. Gong, X. Shi, J. Wan, Y. Zhang, Z. Liu, In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration, Biomaterials 34 (2013) 2787–2795.
[56] N. Mohan, C. Chen, H. Hsieh, Y. Wu, H. Chang, In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in Caenorhabditis elegans, Nano Lett. 10 (2010) 3692–3699.
[57] A. V Titov, P. Kral, R. Pearson, Sandwiched graphene-membrane superstructures, ACS Nano 4 (1) (2010) 229–234.
[58] G. Hilken, J. Dimigen, F. Iglauer, Growth of Xenopus laevis under different laboratory rearing conditions, Lab. Anim. 29 (2) (1995) 152–162.
[59] J.P. Sumpter, P.Y. Le Bail, A.D. Pickering, T.G. Pottinger, J.F. Carragher, The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, Gen. Comp. Endocrinol. 83 (1991) 94–102.
[60] H. Guderley, D. Lapointe, M. Bédard, J.-D. Dutil, Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, Gadus morhua L, Comp. Biochem. Physiol. Part A 135 (2) (2003) 347–356.
[61] M.E. Feder, R.J. Wassersug, Aerial versus aquatic oxygen consumption in larvae of the clawed frog, Xenopus laevis, J. Exp. Biol. 108 (1984) 231–245.
[62] R. Saria, Etude des mécanismes de toxicité des nanotubes de carbone multiparois chez le modèle amphibien Xenopus laevis, Université Paul Sabatier, France, 2014. PhD Thesis.
[63] C.J. Smith, B.J. Shaw, R.D. Handy, Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects, Aquat. Toxicol. 82 (2007) 94–109.
[64] W.W. Burggren, M.E. Feder, A.W. Pinder, Temperature and the balance between aerial and aquatic respiration in larvae of Rana berlandieri and Rana catesbeiana, Physiol. Zool. 56 (2) (1983) 263–273.
[65] A.E. Morales, A. Pérez-Jiménez, M.C. Hidalgo, E. Abellan, G. Cardenete, Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver, Comp. Biochem. Physiol. Part C 139 (2004) 153–161.
[66] R. Saria, F. Mouchet, A. Perrault, E. Flahaut, C. Laplanche, J. Boutonnet, et al., Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles, Ecotoxicol. Environ. Saf. 107 (2014) 22–29.
[67] P. Jackson, N.R. Jacobsen, A. Baun, R. Birkedal, D. Kühnel, K. Alstrup Jensen, et al., Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes, Chem. Cent. J. 7 (1) (2013) 154–165.
[68] M. Chen, J. Yin, Y. Liang, S. Yuan, F. Wang, M. Song, et al., Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish, Aquat. Toxicol. 174 (2016) 54–60.

3. Exemples d'un graphène multi-feuillets et du noir de carbone, ou comment mieux cerner les limites du modèle

Le modèle de croissance utilisé jusque-là (Chapitre 3, parties 1. et 2.) définit la surface des nanoparticules comme le meilleur paramètre descripteur de leur toxicité, indépendamment de leur forme allotropique ou de leur état de dispersion. Considérant que ce modèle pourrait théoriquement être extrapolé à une plus large gamme de particules, il existe néanmoins des exemples de NP pour lesquelles il ne semble pas judicieux de l'appliquer. Ce cas est illustré par deux nanoparticules -le noir de carbone (CB, en anglais « carbon black ») et le graphène multi-feuillets, dit « pencil lead » (FLG-pencil)- pour lesquelles l'expression de la toxicité en fonction de la surface ne gagne pas en pertinence par rapport à l'utilisation conventionnelle de l'unité massique.

Le noir de carbone utilisé est issu du commerce (Lamp Black, FLAMMRUSS 101, Evonik, Francfort). Il a été synthétisé par combustion incomplète d'hydrocarbures de goudron (Commission des normes de l'équité de la santé et de la sécurité du travail, 2016). Son contenu en carbone est élevé (> 97 wt. %) et son diamètre se situe entre 50 et 200 nm. Sa surface spécifique, mesurée par adsorption d'azote, est de 25 $m^2.g^{-1}$. Le FLG-pencil présenté dans cette étude a été fourni par l'Université de Strasbourg dans le cadre de l'ANR G3N[1]. Il a été synthétisé par ablation de mine de crayon (« pencil lead » en anglais) selon un protocole simple, rapide et de bon rendement comme précédemment décrit (Janowska *et al.*, 2012). Le graphène obtenu est majoritairement constitué de 2 à 20 feuillets, de différentes tailles latérales, qui après purification vont de 1,2 à 5,4 µm (pour une moyenne de 2,3 µm) (Muzi *et al.*, 2016). La surface spécifique de ce FLG est estimée à 400 $m^2.g^{-1}$ par absorption au bleu de méthylène (Janowska *et al.*, 2012). L'aspect du CB et du FLG-pencil observées en microscopie à transmission est illustré par la Figure 1.

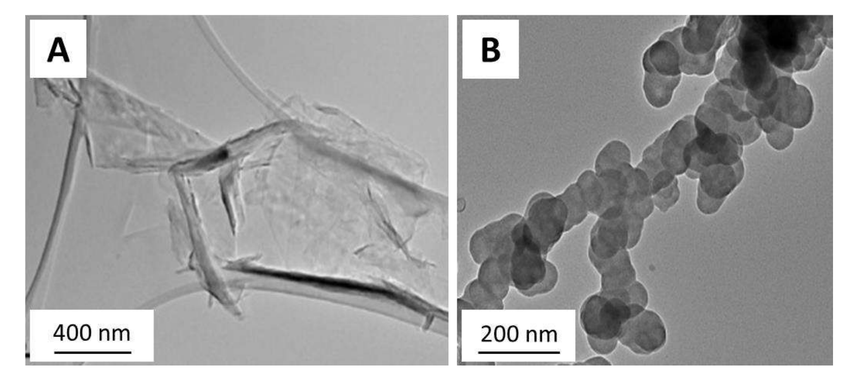


Figure 1. Observations au microscope électronique à transmission du FLG-pencil (**A**) et du CB (**B**)

[1] G3N : Graphène, Nouveaux paradigmes de traitement de l'information, Nanomédecine, Nanométrologie. Grand Défi NANOS lancé par la Mission pour l'interdisciplinaire du CNRS en 2012.

Les larves de xénopes ont été exposées au CB et au FLG-pencil dans des conditions identiques à ce qui a été décrit précédemment, c'est-à-dire 12 jours en conditions normalisées (ISO 21427-1, 2006). La Figure 2 montre l'évolution du taux de croissance des larves exposées à une gamme de CB et de FLG-pencil en fonction soit de la masse, soit de la surface des particules. Les autres NP précédemment traitées dans ce manuscrit sont également reportées sur la figure pour permettre une meilleure interprétation visuelle des différences observées.

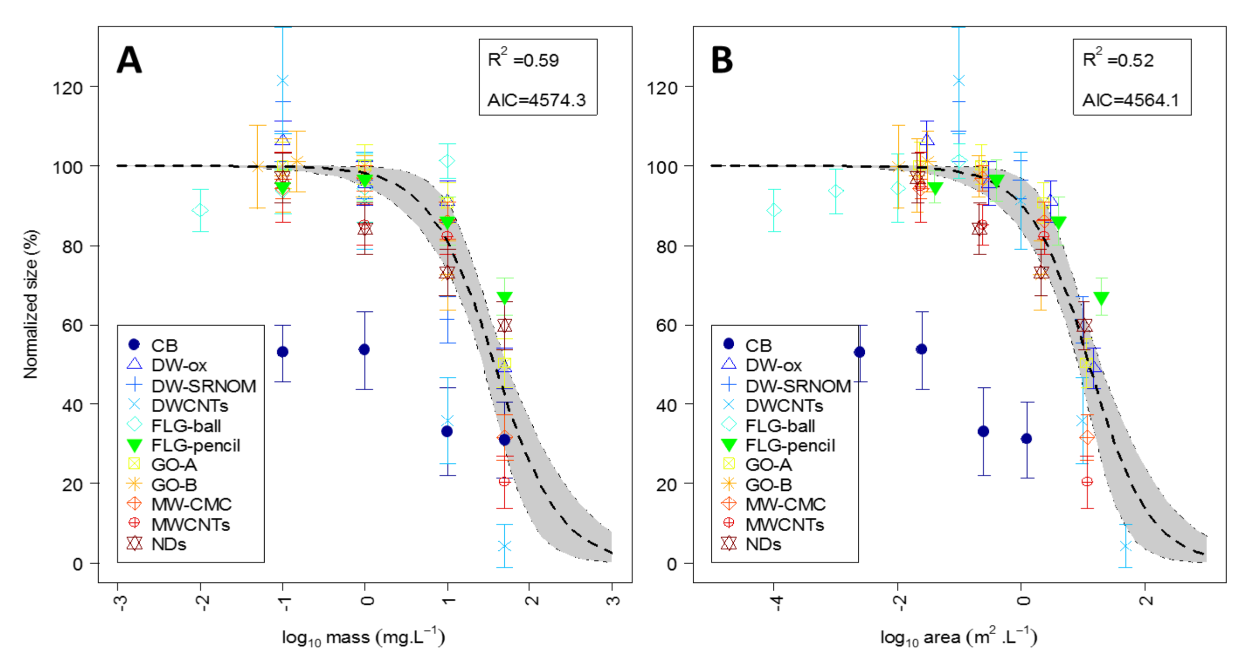


Figure 2. Représentation graphique du taux de croissance des larves en fonction (**A**) de la masse ou (**B**) de la surface des particules. Le noir de carbone (CB ; bleu foncé) et le graphène multi-feuillets dit « pencil lead » (FLG-pencil ; vert clair) ont été ajoutés à la figure initiale (présentée au chapitre 3, partie 2.).

Nous avons vu que la qualité d'un modèle pouvait s'apprécier à travers son R^2 et son AIC. Ici, l'AIC du modèle utilisant la surface (4564,1) est plus faible que celui basé sur la masse (4574,3), indiquant que la surface est toujours le meilleur des deux paramètres (modèle 164 fois plus probable) décrivant l'inhibition de croissance. Néanmoins, les valeurs des AIC et des R^2 sont obtenues à partir de l'ensemble des données traitées, et fournissent donc un résultat global pour l'ensemble des NP. Or, il apparait très clairement que le CB se détache des autres NP, quel que soit le modèle. Il induit une inhibition de croissance à dose bien plus faible que les autres particules -sans pour autant provoquer de toxicité aiguë. Le FLG-pencil, quoique se confondant avec les autres NP dans le modèle « masse » (Figure 2 A), apparait légèrement en-dessus de la tendance générale dans le modèle « surface » (Figure 2 B). Fort de ce constat, et malgré la conclusion statistique (sur la base des AIC) en faveur du modèle « surface », la pertinence de l'un ou l'autre modèle est discutable vis-à-vis du CB et du FLG-pencil. D'ailleurs, les R^2 des deux modèles sont grandement diminués (0,59 et 0,52) lorsque ces deux NP sont prises en

compte (en leur absence, les R^2 étaient de 0,73 et de 0,87 pour les modèles « masse » et « surface », respectivement). Cela traduit ce que l'on observe graphiquement : un manque d'adéquation des données aux modèles pour ces deux particules.

Pourquoi la surface ne permettrait-elle pas de décrire l'inhibition de croissance causée par le CB et le FLG-pencil ? Nous avons vu qu'*a priori*, ni la forme allotropique, ni l'état de dispersion ne pouvait avoir d'influence. Afin de rechercher une autre explication, intéressons-nous à d'autres propriétés des particules. Le noir de carbone présente un comportement assez spécifique impliquant la formation d'une structure complexe au moment même de sa synthèse (Figure 3). Les premières particules à se former sont très petites et identifiées comme étant des nodules (nanoparticules relativement sphériques d'environ 10 à 300 nm de diamètre). Puis, ces nodules s'associent pour former des agrégats (85 à 500 nm) qui deviennent alors des structures indivisibles. Ces agrégats peuvent eux-mêmes s'agglomérer *via* des forces électrostatiques pour former des structures (agglomérats) de 1 à plus de 100 µm (Poisson, 2015). Par conséquent, les structures arborescentes ainsi formées sortent du cadre nanoparticulaire. Cela pourrait expliquer pourquoi le modèle ne décrit pas correctement la réponse des xénopes au CB.

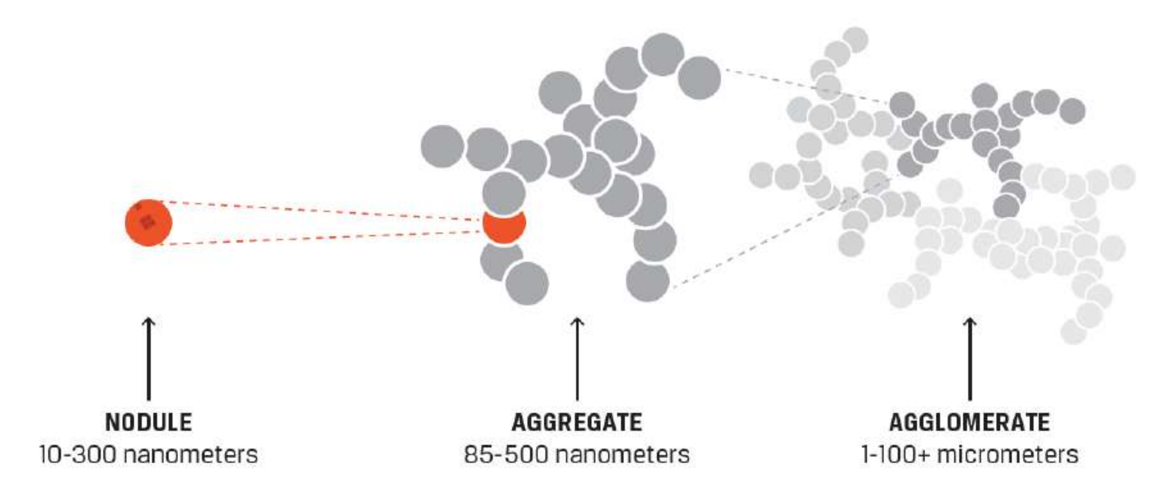


Figure 3. Représentation schématique du développement structurel du noir de carbone à partir d'un nodule (particule primaire, unité fondamentale du noir de carbone), qui fusionne ensuite fortement avec d'autre nodules pour former des agrégats de dimensions colloïdales et de morphologie aciniforme (en forme de grappe). L'intégrité des agrégats est maintenue par des forces électriques qui favorisent également la formation d'agglomérats (d'après International Noir de carbone Association 2016).

Concernant le FLG-pencil, nous aurions pu nous attendre à un effet similaire à celui de l'autre FLG précédemment testé (FLG-ball, pour « ball milling » Figure 2), mais ce n'est pas le cas pour le modèle « surface ». Outre la voie de synthèse qui diffère entre les deux FLG, et d'éventuelles fluctuations biologiques entre les expérimentations, le principal paramètre à

prendre en compte semble être de nouveau la surface spécifique, ou plutôt, la méthode employée pour la mesurer. Celle du FLG-ball (et de toutes les CNP présentées à l'exception du FLG-pencil) a été mesurée par la méthode de Brunauer, Emmett, Teller (BET) (Brunauer *et al.*, 1938). Brièvement, cette méthode consiste en l'adsorption d'une monocouche d'azote sur la surface des particules, à différentes pressions et à la température de l'azote liquide (77 K). Puis, la surface spécifique est déterminée par le calcul en utilisant l'isotherme de BET. De cette façon, seule la surface externe est obtenue. La surface spécifique du FLG-pencil, au contraire, a été déterminée par absorption de bleu de méthylène (Janowska *et al.*, 2012). Compte tenu des dimensions de la molécule de bleu de méthylène, celle-ci est principalement adsorbée à la surface des particules, bien qu'une faible proportion puisse être absorbée entre les feuillets (Chia *et al.*, 2013; Nunes et Guerreiro, 2011). De ce fait, la valeur obtenue est légèrement surévaluée par rapport à la valeur de la surface externe seule. Par conséquent, le FLG-pencil ne peut pas être comparé aux autres CNP sur la base de sa valeur de surface spécifique, d'où l'importance de l'unicité de la méthode de mesure pour l'application du modèle de croissance.

Enfin, notons que d'une manière générale, si le modèle de croissance décrit bien le phénomène d'inhibition de croissance aux fortes doses, aux faibles doses en revanche, l'adéquation du modèle aux données est moins nette. Effectivement, il est possible d'observer des tendances distinctes à faible doses, penchant pour l'inhibition de croissance pour certaines particules (comme le FLG-ball par exemple) ou au contraire pour l'induction de la croissance (DWCNTs, DW-ox) (Figure 2). Ceci suggère que d'autres facteurs physico-chimiques interviendraient en plus de la surface spécifique pour les faibles concentrations. Qui plus est, si les conclusions apportées par le modèle permettent de prédire la CE_{50} théorique ($m^2.g^{-1}$) d'une nanoparticule, elles sont néanmoins limitées au modèle d'étude lui-même et au paramètre biologique concerné. Autrement dit, l'équation demanderait à être testée sur d'autres espèces afin de pouvoir étendre cette conclusion dans une optique d'évaluation du risque environnemental. Par ailleurs, la surface est ici évaluée comme meilleur descripteur de la croissance, mais rien ne permet encore de prédire son importance relative vis-à-vis d'autres paramètres biologiques. Ainsi, le prochain chapitre se propose d'étudier un autre niveau d'expression de la toxicité chez la larve de xénope : la génotoxicité.

<u>Références bibliographiques</u>

Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. J. Am. Chem. Soc. 60, 309‑319. doi:10.1021/ja01269a023

Chia, C.H., Razali, N.F., Sajab, M.S., Zakaria, S., Huang, N.M., Lim, H.N., 2013. Methylene blue adsorption on graphene oxide. Sains Malaysiana 42, 819‑826.

Commission des normes de l'équité de la santé et de la sécurité du travail, 2016. Noir de carbone [WWW Document]. URL http://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/pages/fiche-complete.aspx?no_produit=14043&nom=FLAMMRUSS 101&incr=0 (consulté le 8.7.17).

International Carbon Black Association, 2016. Carbon black user's guide - Safety, health, & environmental information.

ISO 21427-1, 2006. Water Quality-Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei-Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae; International Organization for Standardization. Geneva.

Janowska, I., Vigneron, F., Bégin, D., Ersen, O., Bernhardt, P., Romero, T., Ledoux, M.J., Pham-Huu, C., 2012. Mechanical thinning to make few-layer graphene from pencil lead. Carbon N. Y. 50, 3092‑3116. doi:10.1016/j.carbon.2012.02.064

Muzi, L., Mouchet, F., Cadarsi, S., Janowska, I., Russier, J., Ménard-Moyon, C., Risuleo, G., Soula, B., Galibert, A.-M., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., Bianco, A., 2016. Examining the impact of multi-layer graphene using cellular and amphibian models. 2D Mater. 3, 1‑10. doi:10.1088/2053-1583/3/2/025009

Nunes, C.A., Guerreiro, M.C., 2011. Estimation of surface area and pore volume of activated carbons by methylene blue and iodine numbers. Quim. Nova 34, 472‑476. doi:10.1590/S0100-40422011000300020

Poisson, R., 2015. Un point sur le noir de carbone. Actual. Chim. 395, 63‑64.

Chapitre 4



Etude de la génotoxicité du graphène chez *Xenopus laevis* : un effet lié au degré d'oxydation ?

1. Evaluation de la génotoxicité chez *X. laevis*

La génotoxicité peut être évaluée de différentes façons au sein d'un organisme. Elle peut tout d'abord être mesurée *via* le test des comètes après une exposition à un polluant génotoxique. Cependant, même si le résultat de ce test permet de fournir des informations précieuses sur la capacité d'une substance à engendrer des lésions du matériel génétique, il ne permet d'apprécier que ponctuellement l'état de santé d'une cellule puisqu'il correspond à des dommages primaires généralement réversibles. Effectivement, des mécanismes cellulaires de réparation peuvent intervenir après l'observation de telles dégradations. Néanmoins, la génotoxicité peut également se manifester par l'apparition de micronoyaux (MN) au sein des cellules de l'organisme. Il s'agit de fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers n'ayant pas migré correctement lors de la division cellulaire. Ils se retrouvent alors libres dans le cytoplasme sous forme de petits noyaux qui restent observables après la mitose (Figure 1) (Mouchet, 2002). Ce type de biomarqueur permet de fournir un résultat intégrateur reflétant l'état de santé de l'animal, puisqu'il persiste longtemps après sa formation. C'est donc un marqueur sensible, révélateur du risque génotoxique -voire cancérogène- d'un contaminant.

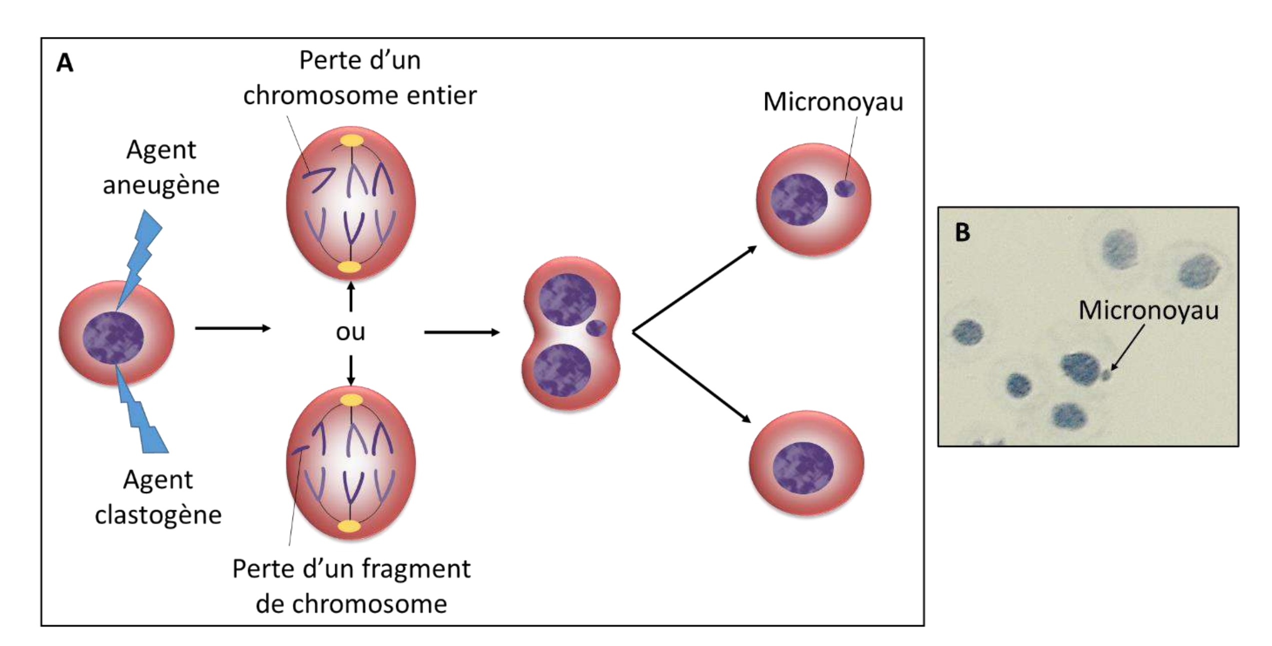


Figure 1. (A) Représentation schématique de la formation d'un micronoyau lors d'une division cellulaire ; (B) Observation microscopique d'érythrocytes de *X. laevis* avec présence d'un micronoyau.

A l'origine de cette formation de micronoyaux peuvent avoir lieu deux types de phénomènes mettant en jeu des effets aneugènes et/ou clastogènes. Dans le premier cas, le micronoyau résulte de la perte d'un chromosome entier suite à l'altération de la structure et/ou du fonctionnement du fuseau mitotique. Ainsi, l'endommagement de l'appareil mitotique peut empêcher la migration d'un chromosome vers un pôle de la cellule lors de l'anaphase. Ce

chromosome forme alors un micronoyau. Dans le second cas, le micronoyau peut apparaitre suite à des évènements clastogènes, c'est-à-dire des cassures chromosomiques. La cible est alors l'ADN, qui subit des lésions double brin de manière directe ou indirecte (Mehta et Haber, 2014). Le fragment de chromosome ainsi perdu dans le cytoplasme forme un micronoyau.

Chez *Xenopus laevis*, la génotoxicité fait l'objet d'un test normalisé qui s'effectue sur les érythrocytes du sang circulant de l'animal (ISO 21427-1, 2006). Comme la formation de micronoyaux ne peut avoir lieu que pendant une mitose, l'exposition des organismes s'effectue au moment où l'index mitotique est le plus élevé afin de maximiser la sensibilité du test. Cette phase d'érythropoïèse intense correspond au stade 50 de développement du xénope selon la table de Nieuwkoop et Faber (1956) (Nieuwkoop et Faber, 1956).

La détermination de la génotoxicité chez *X. laevis* passe par le dénombrement des érythrocytes présentant un ou plusieurs micronoyaux. Pour cela, les larves en fin d'exposition sont préalablement anesthésiées par balnéation (tricaïne méthane sulfonate, MS222, Sandoz) puis ponctionnées au niveau du cœur. Une micropipette héparinée (solution d'héparine lyophilisée à 7‰ de chlorure de sodium) introduite dans le ventricule permet de recueillir le sang à chaque contraction. Puis, un frottis sanguin est réalisé pour chaque individu.

Les étalements sanguins sont ensuite séchés sous air comprimé à pression réduite avant d'être fixés au méthanol absolu pendant 10 minutes. Une solution d'hématoxyline de Groat (constituée à partir du mélange équivolume d'une solution à 10g d'hématoxyline de Groat par litre éthanol 95°C et d'une solution à 20g d'hémalun de fer ammoniacal par litre d'eau à 1,6% d'acide sulfurique concentré) est alors utilisée pour colorer les frottis par immersion pendant 30 minutes. Ce colorant, en faisant ressortir le matériel nucléaire, permettra de mettre en évidence les anomalies chromosomiques. Les lames sont enfin rincées à l'eau du robinet et séchées à l'air libre avant de pouvoir être observées.

La lecture de chaque frottis sanguin s'effectue par microscopie à immersion (Olympus CX41) et consiste à compter le nombre d'érythrocytes micronucléés (comportant de 1 à plus de 3 micronoyaux) sur un total de 1000 érythrocytes. Ce nombre, noté EMN‰, est ainsi obtenu pour chaque larve exposée.

Les valeurs obtenues ne suivant pas une loi normale, le traitement statistique des résultats fait appel au test non-paramétrique de McGill (McGill *et al.*, 1978), basé sur la comparaison des rangs de la médiane et des quartiles. Il nécessite une taille d'échantillon (*n*) supérieure à 7 valeurs, soit plus de 7 larves par condition d'exposition. Les valeurs d'EMN‰ sont classées

par ordre croissant, permettant d'attribuer un rang à chacune des valeurs. Pour chaque groupe d'exposition, il s'agit de calculer le rang de la médiane (M), du quartile inférieur (QI) et du quartile supérieur (QS) comme indiqué dans le Tableau 1. Ainsi, les valeurs de M, QI et QS sont égales aux valeurs d'EMN‰ de rang correspondant.

Tableau 1. Calcul des rangs de la médiane (M), du quartile inférieur (QI) et du quartile supérieur (QS) pour un échantillon de taille *n*.

	Echantillon comportant un nombre pair de valeurs (n = 2p)	**Echantillon comportant un nombre impair de valeurs (n = 2p + 1)**
Rang de M	(p + (p + 1)) / 2	p + 1
Rang de QI	(p + 1) / 2	(p / 2) + 1
Rang de QS	p + ((p + 1) / 2)	(3p / 2) + 1

Enfin, l'intervalle de confiance (IC) est calculé au seuil de sécurité de 95% grâce à la formule suivante :

$$IC = M \pm 1{,}57 \times EIQ/\sqrt{n}$$

Où M est la médiane, *n* la taille de l'échantillon (nombre d'individus par groupe) et EIQ l'intervalle interquartile (EIQ = QS – QI).

La différence entre deux échantillons est significative si leurs intervalles de confiance ne se chevauchent pas. De ce fait, la validation d'un test de micronoyaux s'effectue par comparaison d'un témoin négatif et d'un témoin positif. Le milieu d'exposition est considéré significativement génotoxique dans le cas où la médiane du témoin positif est supérieure à celle du témoin négatif et que leurs IC respectifs n'ont pas de point commun.

2. Génotoxicité chez *X. laevis* après exposition à différentes NPC brutes

Cette partie vise à donner une vision globale des résultats de génotoxicité obtenus chez le xénope suite à l'exposition à différentes nanoparticules carbonées brutes.

Si l'inhibition de croissance du xénope exposé à différentes nanoparticules carbonées peut-être expliquée par leur surface comme énoncé dans le chapitre précédent, ce n'est pas le cas de la génotoxicité. Chez les xénopes exposés à ces nanoparticules, l'expression du nombre d'érythrocytes micronucléés en fonction de différentes unités (présentées en Annexe 3) n'a pas permis de mettre en évidence un paramètre unique décrivant les résultats obtenus. L'approche réalisée sur la croissance n'étant dans ce cas plus pertinente, l'unité traditionnellement utilisée (le milligramme par litre) a donc été retenue pour exprimer les données relatives aux

micronoyaux. D'emblée, la génotoxicité semble reposer sur un ensemble de paramètres complexes.

En premier lieu, les résultats des xénopes exposés à différents NPC brutes sont présentés par la Figure 2. L'exposition des animaux a eu lieu dans les mêmes conditions pour chaque expérience, répondant aux critères de la norme (ISO 21427-1, 2006).

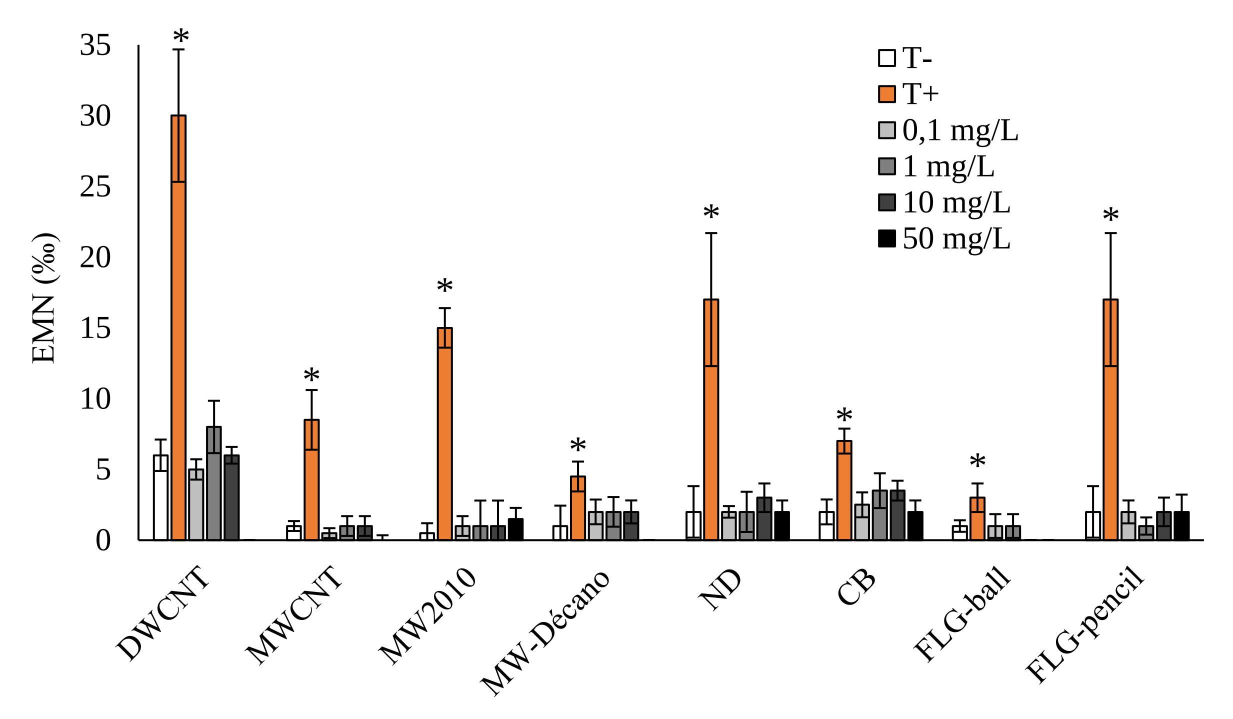


Figure 2. Génotoxicité (érythrocytes micronucléés, EMN ‰) observée chez *X. laevis* après 12 jours d'exposition à différents allotropes de carbone bruts. « * » indique un résultat significatif par rapport au témoin négatif (T-).

Notons que chaque NPC a été étudiée chez un lot de xénopes distinct (issus de géniteurs différents), ce qui peut expliquer certaines différences de sensibilité entre les pontes, en dépit des mêmes conditions d'exposition. En particulier, les témoins négatifs et positifs n'ont pas toujours le même niveau de réponse d'une exposition à l'autre. De ce fait, les résultats de génotoxicité peuvent être comparés entre eux non pas d'après leurs valeurs absolues mais d'après leurs valeurs relatives. Cela nécessite une normalisation des valeurs par rapport aux deux témoins simultanément (négatif et positif). Ce calcul de normalisation, présenté en Annexe 3, ne permet cependant plus de conclure sur la significativité du résultat selon le test de McGill. Or c'est ici ce qui nous intéresse, en priorité. Ainsi, il apparait que pour chaque cas, le témoin positif est significativement différent du témoin négatif, confirmant ainsi la validité de chaque test. Par contre, il apparait qu'aucune induction significative de micronoyaux n'est relevée pour les NPC testées, quelle que soient leurs concentrations. Ainsi, les nanoparticules brutes ne

montrent pas de génotoxicité significative chez les larves dans nos conditions expérimentales. Pourtant, l'innocuité des NPC brutes n'est pas systématique, puisque la littérature fait état de certains cas où elles se sont montrées génotoxiques. C'est par exemple le cas des MWCNT sur les cellules pulmonaires du rat exposé *in vivo* (Muller *et al.*, 2008), ou encore sur différentes lignées cellulaires *in vitro*. De tels effets seraient modulés par des facteurs variés, incluant le diamètre, le nombre de parois, la longueur et la rigidité des nanotubes de carbone (Toyokuni, 2013). Le graphène brut a également entrainé de la génotoxicité chez la crevette (Fernandes *et al.*, 2017) ou sur cellules endothéliales humaines (Sasidharan *et al.*, 2016). Néanmoins, il semblerait que les NPC soient généralement plus génotoxiques sous leurs formes fonctionnalisées, notamment oxydées (Hashemi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013; Patlolla *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2012). La partie suivante se propose d'approfondir ce point à travers l'exemple de l'oxyde de graphène (« graphene oxide » en anglais : GO).

3. Le rôle du degré d'oxydation dans la génotoxicité - Le cas de l'oxyde de graphène

De nombreuses formes de NPC sont possibles. Elles peuvent être chimiquement modifiées et/ou fonctionnalisées avec des hydroxyles, des carboxyles, ou d'autres nanomatériaux. Les NPC non fonctionnalisées, ou brutes, sont majoritairement constituées d'atomes de carbone et sont chimiquement inertes. Insolubles en solution aqueuse, elles sont peu utilisées dans les applications biologiques et médicales. Beaucoup de secteurs d'activité utilisent des NPC oxydées, qui sont plus facilement dispersibles dans divers solvants (Liu *et al.*, 1998). C'est le cas de l'oxyde de graphène (GO), dont la qualité de dispersion facilite sa manipulation et son intégration dans de nombreux matériaux composites (Paredes *et al.*, 2008). Si cette modification de surface permet plus de fonctionnalités dans l'industrie, elle peut en contrepartie être à l'origine d'une plus grande réactivité avec les constituants environnementaux et les êtres vivants.

La publication suivante se propose de traiter en détail les effets de l'oxyde de graphène sur l'induction de micronoyaux. Des renseignements complémentaires (« Supporting information ») font suite à cette publication. Les Annexes 4 et 5 de ce manuscrit fournissent également de plus amples détails concernant la stabilité des dispersions de GO (Annexe 4) et la méthode de mesure des éléments métalliques utilisée dans cette étude (Annexe 5).

Résumé :

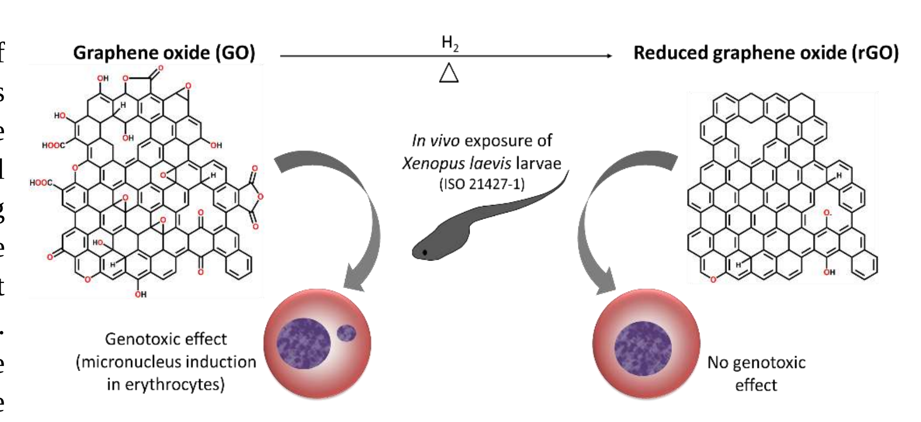
Les propriétés uniques des matériaux de la famille du graphène, nommés GFM, les ont amenés à être utilisés dans de nombreux domaines d'application. De ce fait, à chaque étape du cycle de vie des matériaux les contenant (production, utilisation et fin de vie), elles sont susceptibles d'être libérées dans l'environnement, en particulier dans le compartiment aquatique qui constitue un réceptacle important de pollution. Ainsi, les effets potentiellement néfastes des GFM sur les organismes aquatiques méritent d'être étudiés avec attention. Ce travail se penche sur la génotoxicité de l'oxyde de graphène (GO) chez la larve de l'amphibien *Xenopus laevis* après une exposition semi-statique de 12 jours en conditions normalisées (ISO 21427-1). En tant qu'indicateur pertinent d'effets conséquents comme le potentiel carcinogène d'une substance, la génotoxicité d'un contaminant peut être détectée après une exposition à court terme à celui-ci. Une génotoxicité significative (traduite par l'induction de micronoyaux érythrocytaires) a seulement été observée chez les larves exposées à la plus faible concentration de GO étudiée (0,1 $mg.L^{-1}$). Ce résultat peut s'expliquer par la diminution du nombre d'érythrocytes en mitoses lorsque la concentration augmente, réduisant ainsi la probabilité de formation de micronoyaux. De plus, la biodisponibilité du GO pour les larves est maximisée à faible concentration en raison d'une meilleure stabilité dans le milieu d'exposition (cf. aussi l'Annexe 4 de ce manuscrit pour plus de détails). Dans l'optique d'éclaircir l'origine de la toxicité observée, la pureté du GO a été vérifiée et les impuretés (traces de métaux et de HAP ; cf. Annexe 5) n'ont pas atteint des seuils significatifs de toxicité. La réduction du GO à 200°C sous atmosphère hydrogénée a été effectuée dans le but d'éliminer les fonctions hydroxyle, éther et époxydes (connus pour former des adduits à l'ADN) tout en conservant une bonne dispersibilité du matériau. Aucune génotoxicité n'a été observée chez les xénopes exposés à l'oxyde de graphène réduit (rGO), démontrant la capacité de ce traitement à produire un matériau plus sûr, offrant la possibilité d'être facilement manipulable tout en ayant perdu son potentiel génotoxique.

Removal of genotoxicity of graphene oxide *in vivo*: towards an environmentally safe-by-design approach

Laura Lagier[1], Florence Mouchet[1*], Lauris Evariste[1], Stéphanie Cadarsi[1], Antoine Mottier[1], Pierre Lonchambon[2], Elise Ompraret[1,2], George Chimowa[2], Cyril Sarrieu[2], Anne-Marie Galibert[2], Camélia Matei Ghimbeu[3], Emmanuel Flahaut[2], Eric Pinelli[1] and Laury Gauthier[1]

[1]EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France
[2]CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, UMR CNRS-UPS-INP N°5085, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Bât. CIRIMAT, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9, France
[3]Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M), UMR 7360 CNRS - UHA, 15 rue Jean Starcky, BP 2488, 68057 Mulhouse cedex, France
*Corresponding author: florence.mouchet@ensat.fr
Tel: +33534323936

Abstract



The worldwide increase of graphene family materials (GFMs) raises the question of their potential adverse effects on living beings, especially in the aquatic environment where they could end up. This work focuses on the genotoxicity of graphene oxide (GO) in *Xenopus laevis* larvae following an *in vivo* exposure. Significant genotoxicity (the induction of micronucleated erythrocytes) was observed in larvae only when exposed to the lowest concentration of GO (0.1 mg.L^{-1}). This finding could be explained by (i) the reduction of mitotic erythrocytes with increasing concentrations, reducing the chances of micronucleus formation, and (ii) the maximized bioavailability of GO at low concentrations, due to better dispersion and stability in the exposure medium. GO impurities (e.g., metals and polycyclic aromatic hydrocarbons) did not reach significant toxicity thresholds. To clarify the origin of the genotoxicity, reduction of GO at 200°C in a H_2 atmosphere was used to remove hydroxyl, ether and epoxide groups, without affecting the dispersibility of the material too much. Genotoxicity was no longer observed in *Xenopus* exposed to reduced-graphene oxide, demonstrating the feasibility of this treatment as a “safe-by-design” approach that allows good processing ability to be maintained, while avoiding the genotoxicity of GO.

Key words: *Xenopus laevis*, graphene family nanomaterials, oxygen groups, reduction, low concentration

1. Introduction

Graphene family nanomaterials (GFMs), i.e., 2D materials related to graphene[1], are expected to be used more and more at an industrial scale and to be included in commercial goods, due to their unique properties[2,3]. In particular, graphene oxide (GO) is very attractive due to its stable dispersion in various solvents, facilitating the handling and processing of graphene-based materials[4]. However, GFMs such as GO could also be reactive towards the environment in which they are likely to be released, due to their rich surface functionalities. Compared to the increasing number of studies dealing with the synthesis and application of nanoparticles, relatively few are devoted to the study of their toxicity, especially *in vivo*. Among these studies, most are dedicated to cytotoxicity, whereas genotoxicity (DNA damage) is still relatively poorly investigated[5]. However, genotoxicity may have non-negligible consequences because unrepaired and/or improperly repaired DNA damages may in turn cause new cellular dysfunctions and tumor formation, leading to the death[6] or to the decline of a population[7]. Furthermore, *in vivo* genotoxicity studies essentially focused on the impact of graphene in mice after microinjection[8–10], whereas the impacts on aquatic organisms are far from being fully documented. To our knowledge, GO genotoxicity has not yet been explored in amphibians. The aim of the present work is to assess the potential genotoxic effects of GO, before and after thermal reduction in a hydrogen atmosphere, as well as its possible mechanisms of action in the exposed larvae of *Xenopus laevis*. This amphibian model is widely recognized in ecotoxicology due to its high sensitivity, especially at the larval stage, but also due to its easy breeding, permeable skin and gills[11]. *X. laevis* larvae have previously been used for the ecotoxicological assessment of raw carbon-based nanoparticles[12–16].

2. Experimental

2.1. *Xenopus* rearing and breeding

Xenopus rearing and breeding, as well as exposure conditions, have been described in previous works[12,13]. Briefly, larvae (at stage 50 of the *Xenopus* development table[17]) were exposed for 12 days in semi-static conditions (daily renewal) in groups of 20 animals, according to the international standard 21427-1[18]. The groups were given reconstituted water (RW) alone (negative control, NC); RW completed with cyclophosphamide monohydrate ([6055-19-2], Sigma, France) at 20 $mg.L^{-1}$ (positive genotoxicity control, PC); or experimental media (RW with added GFMs).

2.2. Characterization of the studied GFMs and contamination of the exposure media

The exposure media were prepared daily by dilution of a concentrated suspension of nanoparticles[19]. Two types of GFMs were used: GO and reduced graphene oxide (rGO). Three batches of GO (GO-A, GO-B and GO-C) with very similar chemical compositions (see Table S1, Supporting Information) were used, leading to three exposures of larvae to GO in identical conditions. To modulate the amount of oxygen in GO, as well as the nature of the chemical functions, two rGO samples were produced from GO-B by means of reduction in a H_2 atmosphere at 200°C or 1000°C, leading to rGO200 and rGO1000, respectively. Detailed information concerning the characterization of GFMs and the procedure of contamination is provided in the Supporting Information (Table S1, Figure S1). The surface chemistry of GO and rGOs was evaluated by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (Figure S2 and Table S2, Supporting Information). The identification of the type of oxygen-containing groups present in the materials was also performed by high resolution XPS.

2.3. Genotoxicity assessment

Genotoxicity was assessed at the end of the exposure as previously described[13]. Briefly, the

number of micronucleated erythrocytes (MNE) was counted from a total of 1000 erythrocytes (MNE ‰) in the blood smear from each of the 20 anesthetized larvae (MS222, Sandoz, France) of the experimental group. The ISO-normalized micronucleus test on *Xenopus laevis* larvae[18] was shown to be sensitive and reliable in detecting chromosomal aberrations[20]. Such biomarkers appear to be integrators of all genotoxic events that can occur in erythrocytes over an exposure period. The number of mitotic erythrocytes was also recorded and expressed as number of cells per thousand. The McGill non-parametric test[21] was used for both MNE and mitosis to compare the median values of each group of larvae to the NC.

3. Results and Discussion

Identical results of genotoxicity were obtained regardless of the batch of GO; thus the minor physicochemical differences between GO batches regarding the genotoxic effect on *Xenopus laevis* larvae could be disregarded. Due to this reproducibility, average graphs summarizing the three exposures to GO could be produced (Figure 1). In all experimental groups, larvae exposed to PC show significantly higher median values of MNE ‰ compared to their respective NC group. This finding validates the results of the micronucleus tests. A significant micronucleus induction was observed in erythrocytes of larvae exposed to the lowest concentration (0.1 $mg.L^{-1}$) of GO compared to the NC group, whereas the other concentrations (1 and 10 $mg.L^{-1}$) did not induce significant genotoxicity (Figure 1).

This result demonstrates that GO is able to induce the formation of nuclear abnormalities in larvae. At the molecular level, GO was shown to be an intercalating agent of DNA, which might be one of the main causes of its mutagenic effect[10,22]. According to molecular dynamic simulations, the driving force of interactions between nucleotides and carbon-based nanosurfaces is the π stacking noncovalent interaction between aromatic rings, which may lead to self-assembly between DNA and graphene and potentially, to DNA deformation and breakage[23]. Using cell cultures, Ou and collaborators[24] illustrated different ways that GO can enter cells (i.e., phagocytosis, endocytosis, and passing through the cell membrane by breaking it), leading to several kinds of cell injury including DNA damage. At a broader organizational level, GO was found to induce micronucleated erythrocytes in mice after intravenous injection, where its mutagenesis potential appears to be comparable to cyclophosphamide by inducing DNA damage[10].

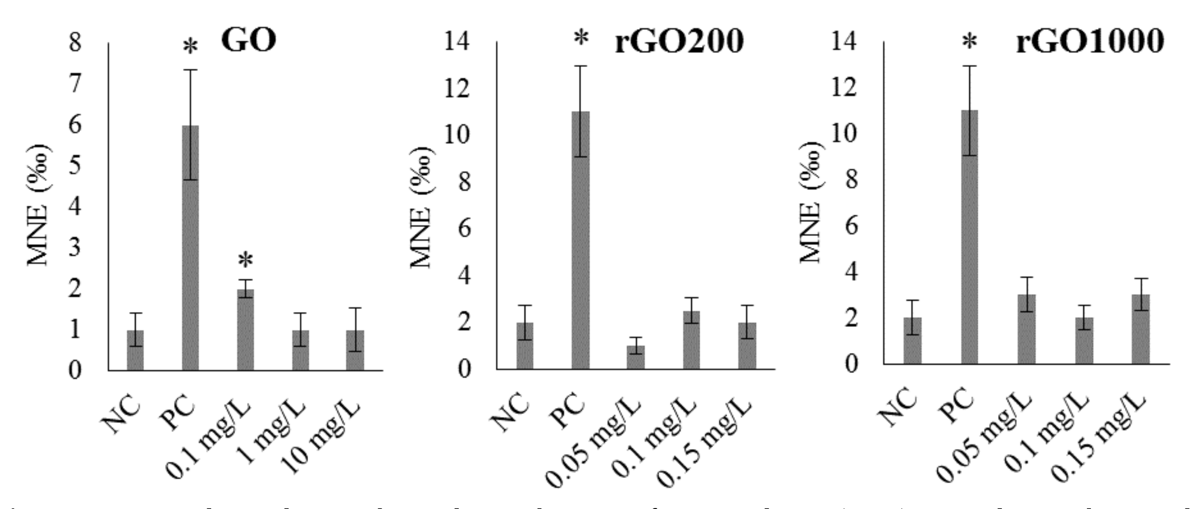


Figure 1. Micronucleus induction observed in erythrocytes of *Xenopus* larvae (*n*=20) exposed to graphene oxide (GO) or reduced graphene oxide (rGO200 or rGO1000) in semi-static conditions for 12 days. MNE: micronucleated erythrocytes; NC: negative control; PC: positive control; *: significant difference compared to the NC.

To shed light on the possible origins of GO genotoxicity in *Xenopus* larvae, the physicochemical properties of GO need to be examined. Recent studies[15,16] have shown that chronic toxicity of carbon-based nanoparticles in *X. laevis* larvae is driven by the surface area of the nanoparticles. However, double-walled carbon nanotubes, which have a higher specific surface area than GO, exhibit no genotoxicity towards *Xenopus* in the same experimental conditions[13], suggesting that the phenomena responsible for chronic toxicity are not the same as those causing genotoxicity. Prior to any interpretation of the results, GO purity was first assessed. Contaminants such as metal ions or PAHs that could emerge during the processing of GO could be responsible for the observed (geno)toxicity, rather than GO itself, which may result in misleading conclusions[25–29]. Although the GO investigated here contains some metallic impurities (Ni, Co, Fe and Mn) and PAH traces (see Supporting Information for detailed methods and results), however, their total concentrations are too low for any significant toxicity to be expected in larvae[30–32].

To explore the origin of the genotoxicity of GO, the C/O ratio of GO was modulated by thermal reduction in hydrogen into rGO200 and rGO1000 (200°C and 1000°C, respectively). The key reason for reducing the material in the presence of hydrogen is to maximize the reduction while keeping the temperature as low as possible. The reduction at 1000°C is thus supposed to be almost total in these conditions, allowing the removal of most oxygenated functional groups. A narrower range of concentrations (0.05 to 0.15 $mg.L^{-1}$) were tested on *Xenopus*, in order to surround 0.1 $mg.L^{-1}$, the concentration at which GO was genotoxic. The results indicate the absence of micronucleus induction, regardless of the tested concentration of rGO200 or rGO1000 (Figure 1). Nanoparticle thickness and lateral dimensions could be determinant for crossing biological membranes and causing toxic effects[24,33]. However, the lateral size of GO and rGOs is similar (Table S1, Supporting Information). As the main difference between GO and rGOs is surface chemistry (C/O ratio and the nature of oxygen functions), this parameter appears to be a good candidate for the origin of the observed genotoxic effect. Even if genotoxicity can be observed after exposure to raw graphene in some cases[34,35], most studies agree that graphene oxide produces more genotoxic effects than its non-oxidized counterpart[10,24,36,37]. No significant genotoxicity could be evidenced in *Xenopus laevis* larvae exposed to pristine multilayer graphene[14]. This result echoes the conclusions of other studies dealing with the impact of raw carbon-based nanoparticles on *X. laevis* larvae, where no genotoxicity was observed regardless of the tested concentration[12,13]. The results of the present work are consistent with these previous studies since GO is not any more genotoxic to larvae after thermal reduction and since the reduction at 200°C is enough to remove the genotoxic effect (Figure 1), while the sample still contains about half of the initial oxygen content (GO: 30.7 at.%; rGO200: 16.2 at.%).

In aquatic ecosystems, there is direct contact between the pelagic fauna and the chemicals suspended or dissolved in water[38]. Yang *et al.* (2013)[8] highlighted that the route of administration should be considered as an important parameter that impacts the toxicity of GO. In our experimental conditions, GFMs could be bioavailable following three main routes of exposure: through the skin, the gills or the digestive tract. Reducing GO at 200°C decreased its stability in the exposure medium (measured on Turbiscan™ [Formulaction] over 24 h; Figure S4, Supporting Information), which may in turn have modified the bioavailability of the nanoparticle for the larvae in the water column. However, whatever the nature of GFMs, we show that after 24 hours, in the absence of animals, the water column is almost free of nanoparticles (close to full sedimentation); while in the presence of animals, this effect is even more accentuated (faster sedimentation)[16]. Sedimentation results evidence the fact that rGO200 has an

intermediate behavior between GO and rGO1000.

Thermal reduction induces changes in the chemical composition of GO. Initially, GO is composed of several oxygen-containing functional groups, regardless of the production process[38]. For the GO used here, the C1s spectra obtained by XPS exhibit two main peaks at 284.6 eV and 286.8 eV (Figure 2), which are correlated with the sp^2 carbon (Csp^2) of the graphene and oxygen functional groups, respectively. The 286.8 eV signal is deconvoluted into several peaks located at 286.8 eV, at 288.6 eV and at 287.61 eV. The most intense one is the 286.8 eV peak (24.7 at. %, Table 1), which corresponds to the carbon involved in hydroxyl groups (C-OH) and ether—and particularly epoxide—groups (C-O-C)[39,40]. The two other peaks are related to carbonyl (C=O) and carboxylic (O=C-O) groups and account for 2.5 and 5.3 at. %, respectively. Thus, GO contains functional groups that could clearly be related to a genotoxic effect, especially epoxides, which are well known for interacting with DNA and potentially leading to DNA adduct formation[41–43]. After annealing GO at 200°C, the C1s spectra exhibit mainly one peak at 284.6 eV, corresponding to the sp^2 carbon in graphene. This peak is narrower compared to that of GO, suggesting an increase in the graphitization level. The intense peak of the epoxide groups (286.8 nm) present on GO is removed by this treatment, leaving in its place the two shoulders associated with the hydroxyl groups and, to a lesser extent, with the ethers/epoxide (C-OH/C-O-C), C=O and O=C-O oxygen functional groups. Stronger reduction conditions (1000°C) result in a material with poorly oxygenated surface groups (Table S2, Supporting Information) and a total oxygen content of 1.5 at. %. Details about the nature of the oxygen groups can also be seen in the O1s spectra (Figure 2).

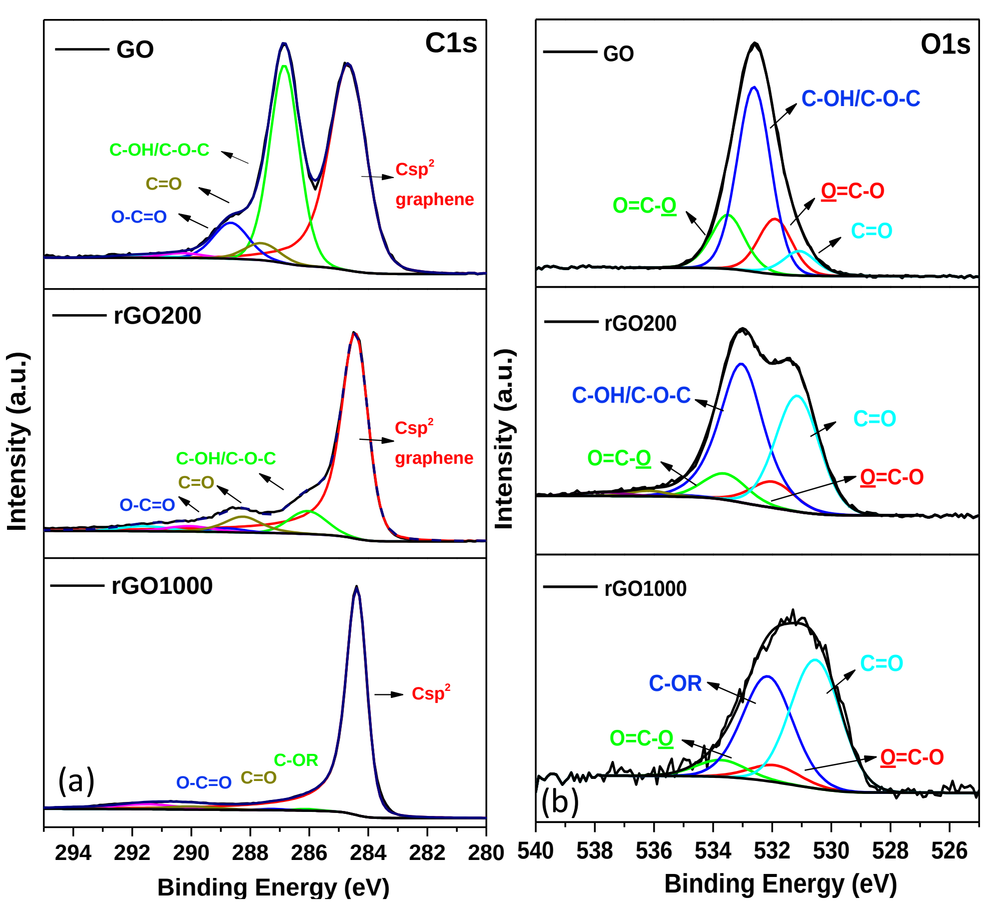


Figure 2. C1s and O1s deconvoluted XPS spectra for GO, rGO200 and rGO1000

Table 1. Assignments of C1s XPS peaks for GO, rGO200 and rGO1000. Csp^2: sp^2 carbon; Sat.: shake-up satellites (π to π^* transitions)

GO		**rGO200**		**rGO1000**	
Peak assignment	**at. %**	**Peak assignment**	**at. %**	**Peak assignment**	**at. %**
Csp^2 graphene	35.5	Csp^2 graphene	64.5	Csp^2 graphene	89.7
C-OH/C-O-C	24.7	C-OH/C-O-C	7.8	C-OH/C-O-C	0.6
C=O	2.5	C=O	5.8	C=O	0.5
O=C-O	5.3	O=C-O	1.3	O=C-O	0.1
Sat.	1.4	Sat.	4.5	Sat.	7.7

The removal of epoxide groups at 200°C is accompanied by the release of CO, CO_2 and H_2O gases, as demonstrated by temperature programmed desorption coupled with mass spectrometry (TPD-MS) spectra, provided in Figure S3 (Supporting Information) and in line with previous works[39]. Larciprete *et al*. (2011)[40] proposed a dual path mechanism for the reduction of oxidized graphene which proceeds by the release of solely molecular oxygen via a cycloaddition reaction from epoxide–epoxide pairs. Formation of ether–epoxide pairs at high O coverage further promotes the elimination of oxygen functional groups by releasing CO/CO_2 mixtures, along with H_2O formation.

Dose-dependent genotoxicity of GO is described in the literature, both *in vitro* and *in vivo*[10,36,44–46]. Surprisingly, our results show a nonmonotonic dose response. GO induced genotoxicity only at the lower tested concentration (0.1 $mg.L^{-1}$; Figure 1). Because the dispersibility of GO is influenced by the concentration (Figure S4, Supporting Information), the toxicity should also be impacted[46]. In addition, the aggregation kinetics and stability of GO are influenced by the presence of salts and by their concentrations. The sheet-sheet aggregation of GO could be induced by adsorbed molecules or ions, leading to a sandwich-like structure[47]. For instance, $CaCl_2$ destabilized GO more aggressively than $MgCl_2$ or NaCl, due to the binding capacity of Ca^{2+} divalent cations with the hydroxyl functional groups of GO[48]. In our experimental conditions, the $CaCl_2$ molar concentration (2 $mmol.L^{-1}$) was higher than the critical coagulation concentration (0.9 $mmol.L^{-1}$). It seems that 0.1 $mg.L^{-1}$ of GO corresponds to a compromise between the aggregation processes and the intrinsic ability to cause genotoxicity.

It is worth mentioning that micronuclei could be induced by multiple mechanisms, including lagging whole chromosomes (aneugenic effect) or lagging acentric chromosomes or chromatid fragments at anaphase (clastogenic effect)[49] and are necessarily observed after cell division. In Table S5 (Supporting Information), the number of mitosis inductions observed in erythrocytes decreases significantly with the increase in GO concentration. Thus, the probability of micronucleus formation could be greatly limited at a high concentration due to mitosis inhibition. Consequently, these results suggest the possible entry of GO into the cells, leading to direct DNA damage. Studies of the impact of GO on cell cultures report that even if GO cannot enter into the nucleus of a cell[50], it may still interact with DNA during mitosis, when the nuclear membrane breaks down[51,52]. However, little is known about the possible means of penetration of GO into *Xenopus* larval organs and cells. GO presumably does not pass through the intestinal barrier during the digestion process as previously assessed for carbon nanotubes in *Xenopus*[13] and for GO derivatives in mice[8]. However, a possible entry through the skin, which is very thin[53], and/or through the gills, which are involved in both respiration and nutrition[54], should not be excluded. Moreover,

many studies agree that GO is responsible for oxidative stress both *in vitro* and *in vivo*[10,45,55,56]. Epoxide functions present in GO could be involved in oxidative stress induction[57]. Even though they are not necessarily associated with chromosome abnormalities[58], reactive oxygen species (ROS) are described as being mainly implied in DNA fragmentation, since they can act as secondary messengers in many intracellular signaling cascades and can lead to cellular macromolecule damage[24,59]. Oxidative stress could also be indirectly responsible for the observed micronucleus formation. Work is currently in progress to more deeply analyze the molecular mechanisms at the gene level related to the genotoxicity induced by GO.

Risk is defined by the combination of hazard and exposure. If exposure itself is difficult to manage due to many possible scenarios, it is still possible to limit the danger of GO by aiming to design a safer nanomaterial. In particular, oxygen-containing functions at the surface of GO deserve specific attention. One of the desirable properties of GO is its good dispersibility, which makes it easier to incorporate into diverse matrices and solvents than pristine graphene[4]. However, for safety reasons, we would recommend the use of GO with much less epoxide function. When treated at 200°C in a H_2 atmosphere, the results show that rGO200 provides a good compromise between dispersibility and safety as it still contains more than half of the oxygen initially present, but without exerting the genotoxic impact. Further reduction up to 1000°C leads to the loss of almost all of the oxygen, but strongly impacts the dispersibility in water, which is close to that of graphene. Depending on the applications, adjusting the oxygen amount with greater accuracy may be interesting to determine the best compromise between retaining the chemical reactivity and removing the genotoxicity; according to our results, the threshold is likely to be close to 200°C.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

This research was supported by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research. The research has also received funding from the European Union Seventh Framework Program under grant agreement n°604391 Graphene flagship.

Samar Hajjar is acknowledged for the help provided with the XPS measurements obtained through the use of the IS2M technical platform.

Linda Ayouni-Derouiche and Inès Guizani are acknowledged for metallic impurities measurement at the Crealins laboratory.

References

(1) Bianco, A.; Cheng, H.-M.; Enoki, T.; Gogotsi, Y.; Hurt, R. H.; Koratkar, N.; Kyotani, T.; Monthioux, M.; Park, C. R.; Tascon, J. M. D.; *et al.* All in the graphene family - A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. *Carbon N. Y.* **2013**, *65*, 1‑6.

(2) Geim, A. K.; Novoselov, K. S. The rise of graphene. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 183‑191.

(3) Geim, A. K. Graphene: status and prospects. *Science (80-.).* **2009**, *324*, 1530‑1534.

(4) Paredes, J. I.; Villar-Rodil, S.; Martinez-Alonso, A.; Tascon, J. M. D. Graphene oxide dispersions in organic solvents graphene oxide dispersions in organic solvents. *Langmuir* **2008**, *24*, 10560‑10564.

(5) Seabra, A. B.; Paula, A. J.; De Lima, R.; Alves, O. L.; Durán, N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem.*

Res. Toxicol. **2014**, *27*, 159‑ 168.

(6) Vuillaume, M. Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutat. Res.* **1987**, *186*, 43‑ 72.

(7) Sukumaran, S.; Grant, A. Effects of genotoxicity and its consequences at the population level in sexual and asexual Artemia assessed by analysis of inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2013**, *757*, 8‑ 14.

(8) Yang, K.; Gong, H.; Shi, X.; Wan, J.; Zhang, Y.; Liu, Z. In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2787‑ 2795.

(9) Zhang, X.; Yin, J.; Peng, C.; Hu, W.; Zhu, Z.; Li, W.; Fan, C.; Huang, Q. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon N. Y.* **2011**, *49*, 986‑ 995.

(10) Liu, Y.; Luo, Y.; Wu, J.; Wang, Y.; Yang, X.; Yang, R.; Wang, B.; Yang, J.; Zhang, N. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1‑ 8.

(11) Gauthier, L. The amphibian micronucleus test, a model for in vivo monitoring of genotoxic aquatic pollution. *Alytes, Int. J. Batrachology* **1996**, *14*, 53‑ 84.

(12) Mouchet, F.; Landois, P.; Sarremejean, E.; Bernard, G.; Puech, P.; Pinelli, E.; Flahaut, E.; Gauthier, L. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis. *Aquat. Toxicol.* **2008**, *87*, 127‑ 137.

(13) Mouchet, F.; Landois, P.; Puech, P.; Pinelli, E.; Flahaut, E.; Gauthier, L. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *5*, 963‑ 974.

(14) Muzi, L.; Mouchet, F.; Cadarsi, S.; Janowska, I.; Russier, J.; Ménard-Moyon, C.; Risuleo, G.; Soula, B.; Galibert, A.-M.; Flahaut, E.; *et al.* Examining the impact of multi-layer graphene using cellular and amphibian models. *2D Mater.* **2016**, *3*, 1‑ 10.

(15) Mottier, A.; Mouchet, F.; Laplanche, C.; Cadarsi, S.; Lagier, L.; Arnault, J.-C.; A. Girard, H.; León, V.; Vázquez, E.; Sarrieu, C.; *et al.* Surface Area of Carbon Nanoparticles: A Dose Metric for a More Realistic Ecotoxicological Assessment. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 3514‑ 3518.

(16) Lagier, L.; Mouchet, F.; Laplanche, C.; Mottier, A.; Cadarsi, S.; Evariste, L.; Sarrieu, C.; Lonchambon, P.; Pinelli, E.; Flahaut, E.; *et al.* Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians. *Carbon N. Y.* **2017**, *119*, 72‑ 81.

(17) Nieuwkoop, P. D.; Faber, J. *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis*; North-Holland, Amsterdam, 1956.

(18) ISO 21427-1. *Water Quality-Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei-Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae; International Organization for Standardization*; Geneva, 2006.

(19) Bourdiol, F.; Mouchet, F.; Perrault, A.; Fourquaux, I.; Datas, L.; Gancet, C.; Boutonnet, J.; Pinelli, E.; Gauthier, L.; Flahaut, E. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae. *Carbon N. Y.* **2013**, *54*, 175‑ 191.

(20) Mouchet, F.; Gauthier, L. Genotoxicity of contaminants: amphibian micronucleus assay. In *Encyclopedia of Aquatic Toxicology*; Férard, J.-F.;

Blaise, C., Éd.; Springer Netherlands, 2013; p. 547‑ 558.

(21) McGill, R.; Tukey, J. W.; Larsen, W. A. Variations of box plots. *Am. Stat.* **1978**, *32*, 12‑ 16.

(22) B. Seabra, A.; J. Paula, A.; De Lima, R.; Luiz Alves, O.; Duran, N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 159‑ 168.

(23) Zhao, X. Self-assembly of DNA segments on graphene and carbon nanotube arrays in aqueous solution: a molecular simulation study. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 6181‑ 6189.

(24) Ou, L.; Song, B.; Liang, H.; Liu, J.; Feng, X.; Deng, B.; Sun, T.; Shao, L. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Part. Fibre Toxicol.* **2016**, *13*, 1‑ 24.

(25) Petersen, E. J.; Henry, T. B.; Zhao, J.; MacCuspie, R. I.; Kirschling, T. L.; Dobrovolskaia, M. A.; Hackley, V.; Xing, B.; White, J. C. Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 4226‑ 4246.

(26) Wu, S.-Y.; An, S. S. A.; Hulme, J. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 9‑ 24.

(27) Abdel-Shafy, H. I.; Mansour, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* **2016**, *25*, 107‑ 123.

(28) Wislocki, P. G.; Wood, A. W.; Chang, R. L.; Levin, W.; Yagi, H.; Hernandez, O.; Jerina, D. M.; Conney, A. H. High mutagenicity and toxicity of diol epoxide derived from benzo[a]pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *68*, 1006‑ 1012.

(29) Yang, K.; Xing, B. Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from carbon nanomaterials in water. *Environ. Pollut.* **2007**, *145*, 529‑ 537.

(30) Klein, C.; Costa, M. Nickel. In *Handbook on the toxicology of metals*; Nordberg, G.; Fowler, B.; Nordberg, M., Éd.; 2014.

(31) Lucchini, R. G.; Aschner, M.; Kim, Y.; Saric, M. Manganese. In *Handbook on the toxicology of metals*; Nordberg, G.; Fowler, B.; Nordberg, M., Éd.; 2014.

(32) Wang, Y.; Wang, J.; Mu, J.; Wang, Z.; Cong, Y.; Yao, Z.; Lin, Z. Aquatic predicted no-effect concentrations of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons and their ecological risks in surface seawater of Liaodong Bay, China. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, *35*, 1587‑ 1593.

(33) Jastrzebska, A. M.; Kurtycz, P.; Olszyna, A. R. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 1‑ 21.

(34) Fernandes, A. L.; Josende, M. E.; Nascimento, J. P.; Santos, A. P.; Sahoo, S. K.; da Silva Junior, F. M. R.; Romano, L. A.; Furtado, C. A.; Wasielesky, W.; Monserrat, J. M.; *et al.* Exposure to few-layer graphene through diet induces oxidative stress and histological changes in the marine shrimp Litopenaeus vannamei. *Toxicoly Res.* **2017**.

(35) Sasidharan, A.; Swaroop, S.; Chandran, P.; Nair, S.; Koyakutty, M. Cellular and molecular mechanistic insight into the DNA damaging potential of few-layer graphene in human primary endothelial cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2016**, *12*, 1347‑ 1355.

(36) Hashemi, E.; Akhavan, O.; Shamsara, M.; Daliri, M.; Dashtizad, M.; Farmany, A. Synthesis and cyto-genotoxicity evaluation of graphene on mice spermatogonial stem cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *146*, 770‑ 776.

(37) Sanchez, V. C.; Jachak, A.; Hurt, R. H.; Kane, A. B. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 15‑ 34.

(38) Nezakati, T.; Cousins, B. G.; Seifalian, A. M. Toxicology of chemically

modified graphene-based materials for medical application. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1987‑2012.

(39) Jung, I.; Field, D. A.; Clark, N. J.; Zhu, Y.; Yang, D.; Piner, R. D.; Stankovich, S.; Dikin, D. A.; Geisler, H.; Ventrice Junior, C. A.; *et al.* Reduction kinetics of graphene oxide determined by electrical transport measurements and temperature programmed desorption. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18480‑18486.

(40) Larciprete, R.; Fabris, S.; Sun, T.; Lacovig, P.; Baraldi, A.; Lizzit, S. Dual path mechanism in the thermal reduction of graphene oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17315‑17321.

(41) Leuratti, C.; Jones, N. J.; Marafante, E.; Kostiainen, R.; Peltonen, K.; Waters, R. DNA damage induced by the environmental carcinogen butadiene: identification of a diepoxybutane-adenine adduct and its detection by 32P-postlabelling. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 1903‑1910.

(42) Luczaj, W.; Skrzydlewska, E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell. Mol. Biolology Lett.* **2003**, *8*, 391‑413.

(43) Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 361‑370.

(44) Wang, K.; Ruan, J.; Song, H.; Zhang, J.; Wo, Y.; Guo, S.; Cui, D. Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 1‑8.

(45) Zhang, M.; Yu, Q.; Liang, C.; Liu, Z.; Zhang, B.; Li, M. Graphene oxide induces plasma membrane damage, reactive oxygen species accumulation and fatty acid profiles change in Pichia pastoris. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, *132*, 372‑378.

(46) Wang, A.; Pu, K.; Dong, B.; Liu, Y.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Duan, W.; Zhu, Y. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene oxide towards human lung fibroblast cells. *J. Appl. Toxicol.* **2013**, *33*, 1156‑1164.

(47) Zhao, J.; Wang, Z.; White, J. C.; Xing, B. Graphene in the aquatic environment: adsorption, dispersion, toxicity and transformation. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 9995‑10009.

(48) Chowdhury, I.; Duch, M. C.; Mansukhani, N. D.; Hersam, M. C.; Bouchard, D. Colloidal properties and stability of graphene oxide nanomaterials in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 6288‑6296.

(49) Fenech, M.; Kirsch-Volders, M.; Natarajan, A. T.; Surralles, J.; Crott, J. W.; Parry, J.; Norppa, H.; Eastmond, D. A.; Tucker, J. D.; Thomas, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* **2011**, *26*, 125‑132.

(50) Mytych, J.; Maciej, W. Nanoparticle technology as a double-edged sword: cytotoxic, genotoxic and epigenetic effects on living cells. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2013**, *4*, 53‑63.

(51) Wang, D.; Zhu, L.; Chen, J.-F.; Dai, L. Can graphene quantum dots cause DNA damage in cells? *Nanoscale* **2015**, *7*, 9894‑9901.

(52) Magdolenova, Z.; Richard Collins, A.; Kumar, A.; Dhawan, A.; Stone, V.; Dusinska, M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 233‑278.

(53) Farquhar, M. G.; Palade, G. E. Functional organization of amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, *51*, 569‑577.

(54) Seale, D. B.; Hoff, K.; Wassersug, R. Xenopus laevis larvae (Amphibia, Anura) as model suspension feeders. *Hydrobiologia* **1982**, *87*, 161‑169.

(55) P. Fu, P.; Xia, Q.; Hwang, H.; C. Ray, P.; Yu, H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22*, 64‑75.

(56) Chen, M.; Yin, J.; Liang, Y.; Yuan, S.;

Wang, F.; Song, M.; Wang, H. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **2016**, *174*, 54‑60.

(57) Fuccelli, R.; Sepporta, M. V.; Rosignoli, P.; Morozzi, G.; Servili, M.; Fabiani, R. Preventive activity of olive oil phenolic compounds on alkene epoxides induced oxidative DNA damage on human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr. Cancer* **2014**, *66*, 1322‑1330.

(58) Saria, R.; Mouchet, F.; Perrault, A.; Flahaut, E.; Laplanche, C.; Boutonnet, J. C.; Pinelli, E.; Gauthier, L. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *107*, 22‑29.

(59) Petersen, E. J.; Nelson, B. C. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 613‑650.

Supporting Information

Removal of genotoxicity of graphene oxide *in vivo*: towards an environmentally safe-by-design approach

Laura Lagier[1], Florence Mouchet[1*], Lauris Evariste[1], Stéphanie Cadarsi[1], Antoine Mottier[1], Pierre Lonchambon[2], Elise Ompraret[1,2], George Chimowa[2], Cyril Sarrieu[2], Anne-Marie Galibert[2], Camélia Matei Ghimbeu[3], Emmanuel Flahaut[2], Eric Pinelli[1] and Laury Gauthier[1]

[1]EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France
[2]CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, UMR CNRS-UPS-INP N°5085, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Bât. CIRIMAT, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9, France
[3]Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M), UMR 7360 CNRS - UHA, 15 rue Jean Starcky, BP 2488, 68057 Mulhouse cedex, France

*Corresponding author: florence.mouchet@ensat.fr
Tel: +33534323936

1. Synthesis and characterization of graphene samples

GOs (batch A (nxGOH_027A), B (nxGOH_028B) and C (nxGOH_37B), respectively GO-A, GO-B and GO-C) were provided by Antolin Group and prepared by oxidation of GANF® (Grupo Antolin Carbon Nanofibers) using the Hummer's method[1,2].

Both rGO result from GO by means of reduction in H_2 atmosphere with a hydrogen flow rate of 5 $L.h^{-1}$ at 200°C or 1000°C in order to acquire rGO200 and rGO1000, respectively. Reduction is performed in controlled conditions and aims to modify only the oxidation degree, with very minimal impact on morphology, lateral size, and number of layers. Thus rGO samples could be considered as rather similar to the starting GO material, except concerning their surface chemistry and their wetting properties, ranging from quite hydrophilic (GO) to very hydrophobic (rGO1000), which plays on their dispersion in water.

Physico-chemical characteristics of each GFM are detailed in Table S1. Specific surface areas were determined by N_2 adsorption using the Brunauer, Emett and Teller's method (BET) on powdered samples of GFMs.

Specific Surface Area was measured using the Brunauer, Emmet and Teller model. After degassing at 100°C for a few hours (until reaching a flat baseline), samples are cooled down to 77K (the temperature of liquid nitrogen) in order to adsorb a monolayer of nitrogen which is later desorbed while heating again the sample. The equipment used for these measurements was a Micrometrics Flow Sorb II 2300.

The morphology of rGO does not seem significantly modified whatever the thermal treatment applied from initial GO (Figure S1). Samples were prepared by dispersion in ethanol, moderate bath sonication for a few minutes and deposition of a few drops on Lacey Carbon TEM grids (air drying). Samples were observed with a JEOL JEM-1400 operated at 120 kV.

Table S1. Physico-chemical characteristics of the carbon-based nanoparticles. GO-A, GO-B, GO-C: graphene oxides of different batches (A, B, C); rGO200, rGO1000: reduced graphene oxides; TEM: transmission electron microscope; HRTEM: high resolution TEM; BET: Brunauer-Emett-Teller method; at. %: atomic %; NM: not measured; GANF®: Grupo Antolin carbon nanofibers.

	GO-A	**GO-B**	**GO-C**	**rGO200**	**rGO1000**
Synthesis / production	GANF® processed by Hummers' method			Thermal treatment in hydrogen (5 $L.h^{-1}$) at 200°C (2h)	Thermal treatment in hydrogen (5 $L.h^{-1}$) at 1000°C (2h)
Catalyst	Ni, Fe, Co, Mn			None	None
Carbon content	69 at. %	NM	69.3 at. %	83.8 at. %	98.5 at. %
Oxygen content	31 at. %	NM	30.7 at. %	16.2 at. %	1.5 at. %
Number of layers (HRTEM)	1-5[3,4]			1-5[3,4]	1-5[3,4]
Lateral size (TEM)	0.2 to 8 µm			0.2 to 8 µm	0.2 to 8 µm
Specific surface area (BET)	228 $m^2.g^{-1}$	253 $m^2.g^{-1}$	206 $m^2.g^{-1}$	16 $m^2.g^{-1}$	175 $m^2.g^{-1}$

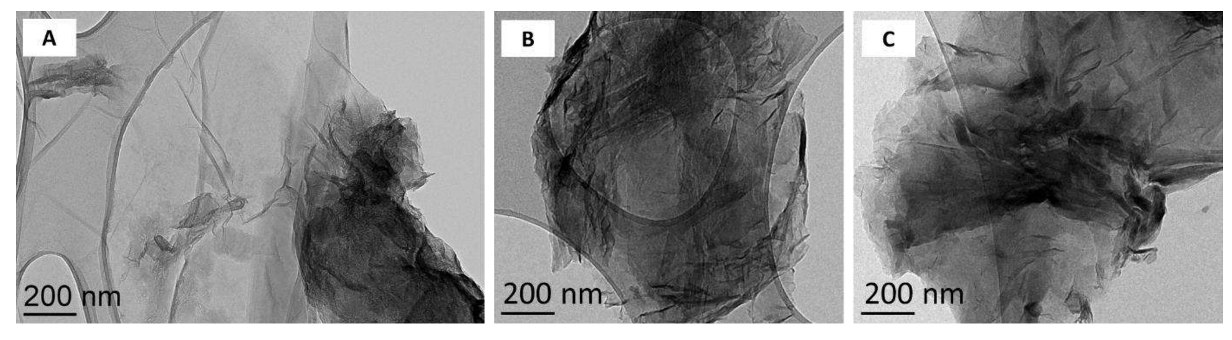


Figure S1. Transmission electron microscopy micrographs of (A) GO-A, (B) rGO200, (C) rGO1000. GO-B and GO-C are not shown but are similar to GO-A.

Data of elemental analysis (percentage of O and C atoms) were obtained by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) spectra were recorded with a VG SCIENTA SES-2002 spectrometer equipped with a concentric hemispherical analyzer. The incident radiation used was generated by a monochromatic Al Kα x-ray source (1486.6eV) operating at 420 W (14kV; 30mA). Widescan and high resolution (C1s and O1s) XPS spectra were recorded on a surface of approximately 3 mm^2 and the base pressure in the analysis chamber during experimentation was about 10^{-9} mbar. Spectra were subjected to a Shirley baseline and peak fitting was made with mixed Gaussian-Lorentzian components with equal full-width-at-half-maximum (FWHM) using CASAXPS version 2.3.17 software. The surface composition expressed in atom % was determined using integrated peak areas of each component and takes into account transmission factor of the spectrometer, mean free path and Scofield sensitivity factors of each atom. All the binding energies (BE) are referenced to the C1s peak (sp^2 carbon atoms) from the "graphitic material" at 284.6 eV and given with a precision of 0.1eV. The survey spectra obtained by XPS technique (Figure S2) shows the presence of only carbon and oxygen with no impurity detected.

The carbon content in the pristine GO was 69.3 at. % while the oxygen is found in high quantity, i.e., 30.7 at. %. The reduction of GO at 200°C and 1000°C induced a gradual removal of oxygen from 30.7 at. % for GO, to 16.2 at. % for rGO200 and 1.5 at% for rGO1000, respectively (Table S2). In the same time the carbon content was increased to 83.8 at. % and 98.3 at. % for rGO200 and rGO1000.

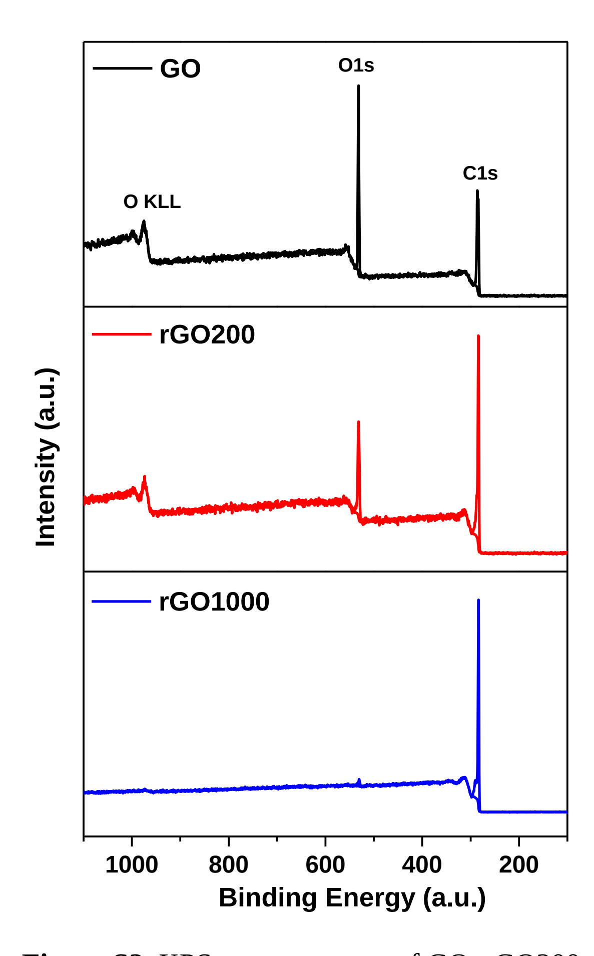


Figure S2. XPS survey spectra of GO, rGO200 and rGO1000 materials.

Infrared spectroscopy was also used for further characterization of the GO, rGO200 and rGO1000 samples in transmission mode using KBr pellets into which the samples were included. However, the presence of residual moisture, difficult to remove through thermal treatment because it would transform the sample, made the data analysis complex and finally much less useful than XPS.

The removal of epoxide groups at 200°C is accompanied by the release of CO, CO_2 and H_2O gases, as demonstrated by temperature programmed desorption coupled with mass spectrometry (TPD-MS) spectra (Figure S3).

Table S2. Assignments of C1s and O1s XPS peaks for GO, rGO200 and rGO1000 materials. Csp^2: sp^2 carbon; Sat: shake-up satellite peaks

XPS peak	GO		rGO200		rGO1000	
	Peak assignement	at. %	Peak assignement	at. %	Peak assignement	at. %
C1s	Csp^2 graphene	35.5	Csp^2 graphene	64.5	Csp^2 graphene	89.7
	C-OH/C-O-C	24.7	C-OH/C-O-C	7.8	C-OH/C-O-C	0.6
	C=O	2.5	C=O	5.8	C=O	0.5
	O=C-O	5.3	O=C-O	1.3	O=C-O	0.1
	Sat.	1.4	Sat.	4.5	Sat.	7.7
	Total	**69.3**	**Total**	**83.8**	**Total**	**98.5**
O1s	O=C-O (O underlined)	5.3	O=C-O (O underlined)	1.3	O=C-O (O underlined)	0.1
	O=C-O (second O underlined)	5.3	O=C-O (second O underlined)	1.3	O=C-O (second O underlined)	0.1
	C-OH/C-O-C	17.7	C=O	5.8	C=O	0.7
	C=O	2.4	O=C-OH/C-O-C	7.4	C-OR	0.6
			H_2O	0.3		
			Sat.	0.2		
	Total	**30.7**	**Total**	**16.2**	**Total**	**1.5**

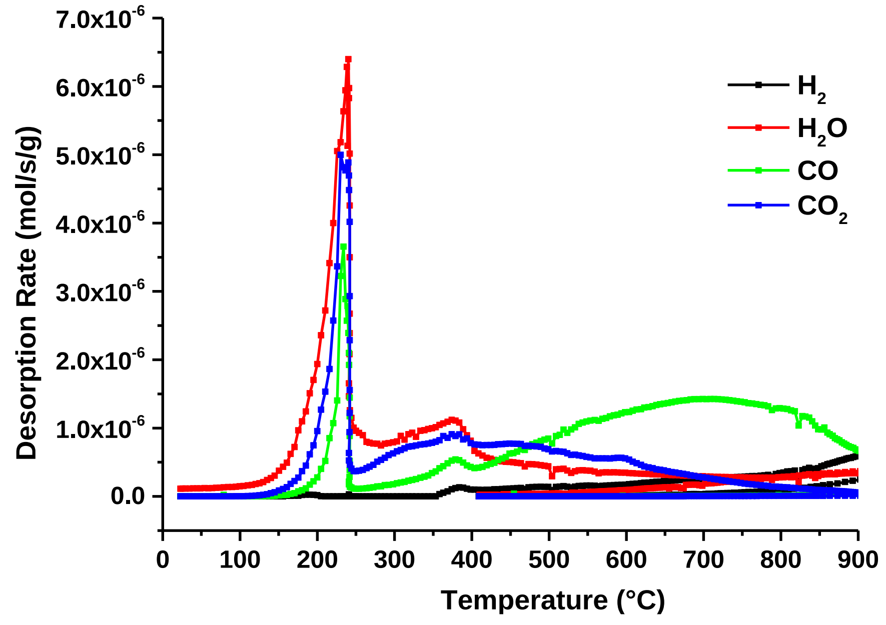


Figure S3. TPD-MS gas profiles of GO heated under vacuum up to 900°C.

2. Graphene physical dispersion and contamination of the exposure media

The desired quantity of graphene powder was first weighed and dispersed in deionized water to obtain a stock suspension. GO was already rather hydrophilic and did not require further homogenization, but rGO stock suspensions were homogenized by dispersion using appropriate mechanical methods such as shear mixing with a homogenizer (SILVERSON L5M) at 8000 rpm followed by a pulsed sonication of 30 minutes (Vibra-cell 75042 -500 W – 3s on/3s off) with a probe of 1 cm diameter at 30% amplitude. Then, depending on the desired concentration, required amounts of this

stock suspension (including rGO and GO) were sampled under ultrasonic bath before being introduced in individual glass test tubes and adjusted to 20 mL by addition of deionized water. For each concentration, 12 test tubes of 20 mL were thus prepared, corresponding to the number of exposure days. Afterwards, just before contaminating the water column, the 20 mL suspensions of graphene were dispersed for 2 minutes in an ultrasonic bath (Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 kHz). Finally, they were poured in crystallizing dishes and the test tubes were rinsed twice with reconstituted water (RW) to collect remaining CNPs on the tubes walls. Crystallizing dishes were finally leveled to 2L with RW before introducing the organisms.

The dispersion of GO and rGO200 in the medium of exposure (deionized water added with salts), in absence of *Xenopus*, is shown by Figure S3. Note that low concentrations of exposure could not be detected by Turbiscan™. Consequently Figure S3 shows the fate of GO and rGO200 at concentrations going beyond the concentration range of exposure. GO stay longer in suspension than rGO, but after 24h, in any case, the water column is nearly free of nanoparticle, whatever their tested concentration. Indeed, the final transmission values of GO and rGO200 suspensions tend to approach the transmission value of water alone (80.5 % in average). In presence of *Xenopus*, the purification of the water column from GO or rGOs is supposed to be faster due to the filter behavior of larvae.

3. Metals concentration analysis in graphene oxide

The synthesis processes of GANF® (grupo Antolin carbon nanofibers), the precursor used to prepare the GO, involve Ni, Co, Fe and Mn as metal catalysts. Such metals could take part in the potential toxicity observed in *Xenopus*. The eventual presence of metals residues in GO was so checked, as described by Ayouni-Derouiche (2014)[5]. Briefly, analysis was performed by mineralizing GO powder thanks to microwave (Milestone UltraWAVE) under acidic conditions. The metal content of the samples were measured by ICP AES, iCAP™ 6300 analyzer (Thermo Fisher Scientific) (Crealins). The experimental method was validated using certified reference material SWCNT-1 (Single-Wall Carbon Nanotube; National Research Council Canada). Recoveries of certified reference material were 91 ± 5%.

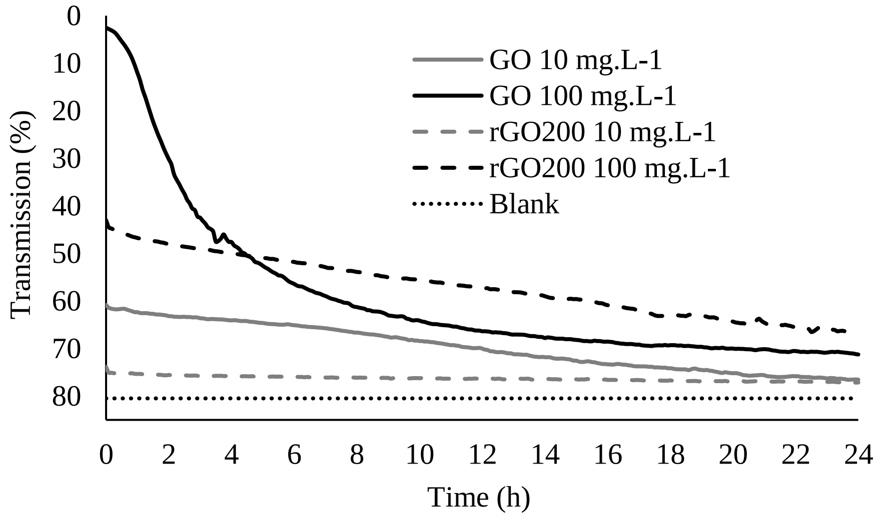


Figure S4. Monitoring of the stability of GO and rGO200 dispersion in the water column of exposure medium over 24 hours (in absence of *Xenopus* larvae), expressed by the percentage of transmission detected after the light goes through the sample. Blank: medium without nanoparticles (distilled water added with salts)

Results of metallic residues are expressed in milligrams of metal per liter of exposure medium (Table S3). According to these results, at the highest GO concentration tested (10 $mg.L^{-1}$), the concentration of metals in the exposure medium would be of $6.9.10^{-4}$, < $2.3.10^{-4}$, < $6.0.10^{-4}$ and $149.8.10^{-4}$ $mg.L^{-1}$ for Ni, Co, Fe and Mn, respectively. Moreover, after 12 days of exposure to 10 $mg.L^{-1}$ of GO in 2 L of medium, the total amount of metal potentially bioavailable for larvae during the total exposure time would be $16.6.10^{-3}$, < $5.52.10^{-3}$, < $14.4.10^{-3}$ and $359.52.10^{-3}$ µg of Ni, Co, Fe and Mn, respectively. However, these values would be slightly under-estimated due to the difficulty of metal analysis in such nanocarbon matrix (efficiency of 91 ± 5% according to the recovery of the certified reference material).

Table S3. Concentration of metals derived from GO (Ni: nickel; Co: cobalt; Fe: iron; Mn: manganese) in the medium of exposure at the highest GO concentration tested (10 $mg.L^{-1}$).

	Metals concentrations in the medium ($mg.L^{-1}$)
Ni	$6.9.10^{-4}$
Co	< $2.3.10^{-4}$
Fe	< $6.0.10^{-4}$
Mn	$149.8.10^{-4}$

4. PAHs concentration analysis in graphene oxide

PAHs could also be associated with GO because of their possible generation during GO synthesis and their high affinity for hydrophobic domains of carbon based nanoparticles. As for metals, such molecules could be responsible for toxic effects in *Xenopus*, so checking their concentration in GO is relevant. PAHs analysis was performed by MicroPolluants Technology S.A. society from GO dispersion in deionized water by gas chromatography-mass spectrometry according to the normalized procedure NF ISO 28540 (MicroPolluants Technologie S.A., France). 32 different PAHs were analyzed but only those with a concentration higher than the quantification limit are listed in Table S4.

In terms of concentrations in the medium of exposure for GO at 10 $mg.L^{-1}$, the PAHs concentrations ranges from $2.4.10^{-4}$ $µg.L^{-1}$ for Fluoranthene and Benzo(a)anthracene to $5.8.10^{-4}$ $µg.L^{-1}$ for 2-Methyl Naphtalene. The total concentration of PAHs would be at least $24.8.10^{-4}$ $µg.L^{-1}$. After 12 days of exposure, that would correspond to a total amount of $5.95.10^{-2}$ µg of PAHs to which *Xenopus* were exposed.

Table S4. PAHs concentrations derived from GO in the medium of exposure at the highest GO concentration tested (10 $mg.L^{-1}$). Among 32 analyzed PAHs, only PAHs with a concentration greater than 20 mg per kg of GO powder are reported in the present work.

	PAHs concentrations in the medium ($µg.L^{-1}$)
Naphtalene	$3.5.10^{-4}$
Acenaphtene	$2.5.10^{-4}$
Phenanthrene	$3.2.10^{-4}$
Fluoranthene	$2.4.10^{-4}$
Benzo(a)anthracene	$2.4.10^{-4}$
Chrysene	$2.5.10^{-4}$
Benzo(b+j)fluoranthene	$2.5.10^{-4}$
2-Methyl Naphtalene	$5.8.10^{-4}$

5. Mitotic erythrocytes in *X. laevis* exposed to GO, rGO200 and rGO1000

Micronucleus corresponds to a chromosomal abnormality that occurs during a cellular division. Mitotic erythrocytes were counted in the blood smear of larvae exposed to GO, rGO200 and rGO1000 (from a total of 1000 erythrocytes). The results (Table S5) show that the number of cellular divisions decreases significantly with the increase in GO concentration, whereas both rGO did not induce significant difference compared to the NC. Thus, the probability of micronucleus formation significantly decreases in larvae exposed to the highest concentration of GO.

Table S5. Mitosis induction (‰ ± 95% confidence interval) observed in erythrocytes of *Xenopus* larvae (*n*=20) exposed to graphene oxide (GO) or reduced graphene oxide (rGO200 or rGO1000) in semi-static conditions for 12 days. NC: negative control; PC: positive control; NA: not available; *: significant difference compared to the NC.

Mitotic erythrocytes (‰)	NC	PC	0.05 $mg.L^{-1}$	0.1 $mg.L^{-1}$	0.15 $mg.L^{-1}$	1 $mg.L^{-1}$	10 $mg.L^{-1}$
GO	10.0±1.6	10.0±1.1	NA	12.0±1.7	NA	9.0±1.4	5.0±1.3*
rGO200	7.5±2.6	8.0±2.3	11.0±2.7	12.0±2.6	12.0±2.3	NA	NA
rGO1000	7.5±2.6	8.0±2.3	14.0±3.7	11.0±2.0	13.5±3.2	NA	NA

References

(1) Hummers, W. S.; Offeman, R. E. Preparation of graphitic oxide. **1958**, *80*, 1339.

(2) Lobato, B.; Merino, C.; Barranco, V.; A. Centeno, T. Large-scale conversion of helical-ribbon carbon nanofibers to a variety of graphene-related materials. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 57514–57520.

(3) Tabet, L.; Bussy, C.; Amara, N.; Setyan, A.; Grodet, A.; J. Rossi, M.; Pairon, J.-C.; Boczkowski, J.; Lanone, S. Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **2009**, *72*, 60–73.

(4) Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (Anses). *Avis relatif à « l'évaluation des risques liés au GRAPHISTRENGTH C100 réalisée dans le cadre du programme Genesis »; Saisine N° 2007-SA-0417*; 2011.

(5) Ayouni-Derouiche, L.; Méjean, M.; Gay, P.; Milliand, M.-L.; Lantéri, P.; Gauthier, L.; Flahaut, E. Development of efficient digestion procedures for quantitative determination of cobalt and molybdenum catalyst residues in carbon nanotubes. *Carbon N. Y.* **2014**, *80*, 59–67.

4. Génotoxicité du GO chez le xénope : prolongement et perspectives

L'étude de l'induction de micronoyaux chez le xénope exposé au GO ouvre la voie sur de nouvelles perspectives, incluant l'approfondissement de la connaissance des mécanismes de toxicité du GO chez le xénope, la comparaison de l'induction de génotoxicité chez d'autres organismes par le GO, ou encore l'effet génotoxique d'autres nanoparticules carbonées de surface chimiquement modifiée et/ou fonctionnalisée. Ces voies ont commencé à être explorées au laboratoire Ecolab et sont ici brièvement décrites.

4.1. Génotoxicité d'autres NPC de surface chimiquement modifiée et/ou fonctionnalisée chez le xénope

Tout d'abord, l'étude d'autres nanoparticules carbonées de surface chimiquement modifiée et/ou fonctionnalisée et de leur potentiel impact génotoxique chez le xénope a été menée à partir de nanotubes de carbones. Ces derniers correspondent aux nanotubes de carbone multi-paroi fonctionnalisés par la TEG-amine (triéthylène glycol-amine ; MW-TEG-amine) et aux nanotubes de carbone double paroi oxydés (DW-ox) pour ce qui est des dispersions covalentes. Ces particules ont été fournies dans le cadre de l'ANR Décano (MW-TEG-amine) ou synthétisées au laboratoire CIRIMAT (DW-ox). Deux autres NPC sont quant à elles dispersées de manière non covalente par ajout de carboxyméthylcellulose à des nanotubes multi-paroi (MW-CMC) ou par ajout de matière organique naturelle de la rivière Suwannee à des nanotubes double paroi (DW-SRNOM). Avant d'être mélangés avec la CMC ($C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$, Fluka) ou la SRNOM (1R101N, International Humic Substances Society, IHSS), les nanotubes de carbone bruts utilisés ont été synthétisés au CIRIMAT dans le cadre de la thèse de Floriane Bourdiol (Bourdiol, 2013). Les caractéristiques propres à ces NPC ont préalablement été décrites dans le Chapitre 2, partie 2 de ce manuscrit. Comme précédemment, les larves de xénope ont fait l'objet d'une exposition de 12 jours à ces particules en conditions normalisées (ISO 21427-1, 2006) pour en connaitre le potentiel génotoxique. Les résultats correspondants sont présentés dans la Figure 1.

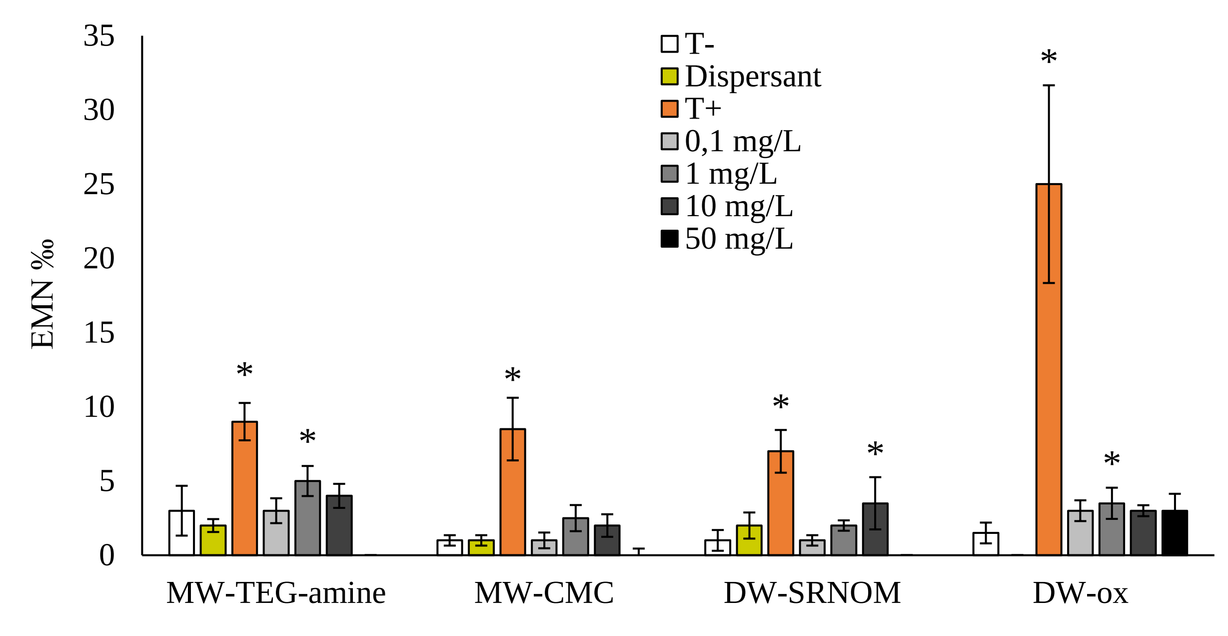


Figure 1. Génotoxicité (érythrocytes micronucléés, EMN ‰) observée chez *X. laevis* après 12 jours d'exposition à différents allotropes de carbone de surface chimiquement modifiée et/ou fonctionnalisée. « * » indique un résultat significatif par rapport au témoin négatif (T-). Dispersant : dispersant chimique seul, sans NPC.

Contrairement à leurs équivalents bruts, il apparait que les NPC dispersés entrainent une induction significative des micronoyaux à certaines concentrations (MW-TEG-amine, DW-SRNOM, DW-ox), ou tout du moins une tendance à la hausse (MW-CMC). A l'exception des DW-SRNOM qui montrent un effet dose-dépendant aux concentrations testées, il semble qu'une réponse comparable au GO se produise, avec un effet maximisé en milieu de gamme. Il s'agit ici de la concentration 1 mg.L^{-1} -concentration jugée néanmoins élevée par rapport à ce qui pourrait se trouver dans l'environnement. Pris dans leur ensemble, ces résultats confirment le rôle de la chimie de surface dans la toxicité des NPC. Des hypothèses similaires à celles énoncées dans le cas du GO peuvent être formulées en vue d'expliquer ces résultats : tout d'abord, la génotoxicité observée est liée au taux de mitoses érythrocytaires. Ces dernières, présentées par la Figure 2, peuvent fluctuer en fonction de la concentration mais aussi du dispersant chimique utilisé, à l'instar de la CMC qui tend à induire les divisions cellulaires, tandis que la SRNOM les inhibe. En règle générale, la génotoxicité tend à augmenter avec le nombre de mitoses, à l'exception des DW-SRNOM qui montrent une induction de micronoyaux alors que les divisions cellulaires sont inhibées par rapport au témoin négatif (leur nombre n'étant pas nul pour autant).

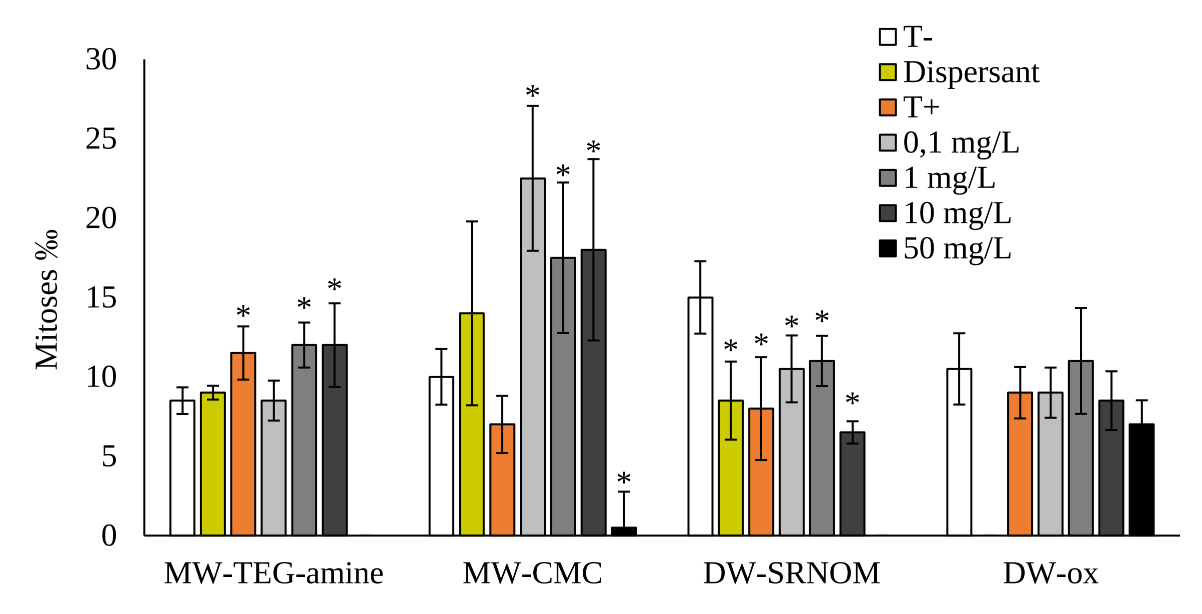


Figure 2. Mitoses (‰) dénombrées dans les érythrocytes du sang circulant de xénope exposés pendant 12 jours à différents allotropes de carbone de surface chimiquement modifiée et/ou fonctionnalisée. « * » indique un résultat significatif par rapport au témoin négatif (T-). Dispersant : dispersant chimique seul, sans NPC.

D'autre part, par opposition aux formes brutes, la dispersion des particules pourrait prolonger leur temps de contact avec les organismes dans la colonne d'eau et ainsi augmenter leur biodisponibilité et le risque de voir apparaitre des micronoyaux. Les fonctions covalentes présentes à la surface pourraient jouer un rôle dans le potentiel génotoxique des NPC, directement ou par le biais du stress oxydatif.

Néanmoins, les données de caractérisation des NPC testées nous contraignent à rester au stade d'hypothèse pour expliquer leur génotoxicité. Leur pureté, leur cinétique de sédimentation, leur degré d'oxydation, les fonctions qui les composent ainsi que leurs proportions, et leurs capacités d'adsorption/désorption avec la CMC et la SRNOM ne sont par exemple pas connus. C'est là que ressort une difficulté fréquemment rencontrée lors de l'étude des NPC en laboratoire, à savoir leur quantité disponible. Celle-ci, généralement limitée à quelques grammes, ne permet pas toujours de mener de front une exposition des organismes et une analyse physico-chimique systématique et complète. Pour couvrir des besoins plus larges, plusieurs lots de NPC sont parfois nécessaires. La vigilance est alors de rigueur pour ne pas assimiler deux lots distincts à un produit identique. En effet, deux lots de MWCNT peuvent par exemple présenter des nanoparticules de pureté, de longueur moyenne, de diamètre et de nombre de couches différents. Aussi, extrapoler les caractéristiques physico-chimiques et les effets toxicologiques de l'un à l'autre peut être erroné. Malgré tout, deux lots de NPC peuvent aussi avoir des caractéristiques et des comportements très proches, d'autant plus s'ils proviennent d'un même fournisseur, comme c'est le cas pour le GO dans notre étude.

4.2. Génotoxicité du GO chez un autre amphibien : *Pleurodeles waltl.*

A présent démontrée chez le xénope, la génotoxicité du GO demande à être testée chez d'autres organismes, cela afin d'assoir nos conclusions précédentes et aussi dans une démarche pas à pas (espèce par espèce) en vue d'une exposition ultérieure de tous les organismes étudiés en mésocosme. Ici, l'espèce en question n'est autre que *Pleurodeles waltl.*, amphibien choisi entre autres pour sa position dans la chaine alimentaire en tant que prédateur, dès les premiers stades larvaires, ainsi que pour sa pertinence comme bioindicateur de polluants génotoxiques. A l'origine, c'est en effet sur cette espèce que fut mis en œuvre le test des micronoyaux (Fernandez *et al.*, 1993; Jaylet *et al.*, 1986). Les larves de pleurodèle offrent un parfait moyen de comparaison aux larves de xénope, puisque le même test normalisé de 12 jours en conditions semi-statiques est appliqué aux deux espèces (ISO 21427-1, 2006). Des différences de sensibilité peuvent donc être mises en évidence entre les deux amphibiens après une exposition au GO. Ainsi, la génotoxicité du GO chez le pleurodèle -accompagnée par le nombre de mitoses érythrocytaires- est illustrée dans la Figure 3. Une large gamme de concentrations est étudiée -allant de 0,05 à 50 mg.L^{-1}- afin de comparer des concentrations d'exposition similaires à celles étudiées chez le xénope, mais aussi afin d'encadrer plus finement la concentration trouvée génotoxique précédemment : 0,1 mg.L^{-1}. Notons qu'aucune mortalité n'est observée.

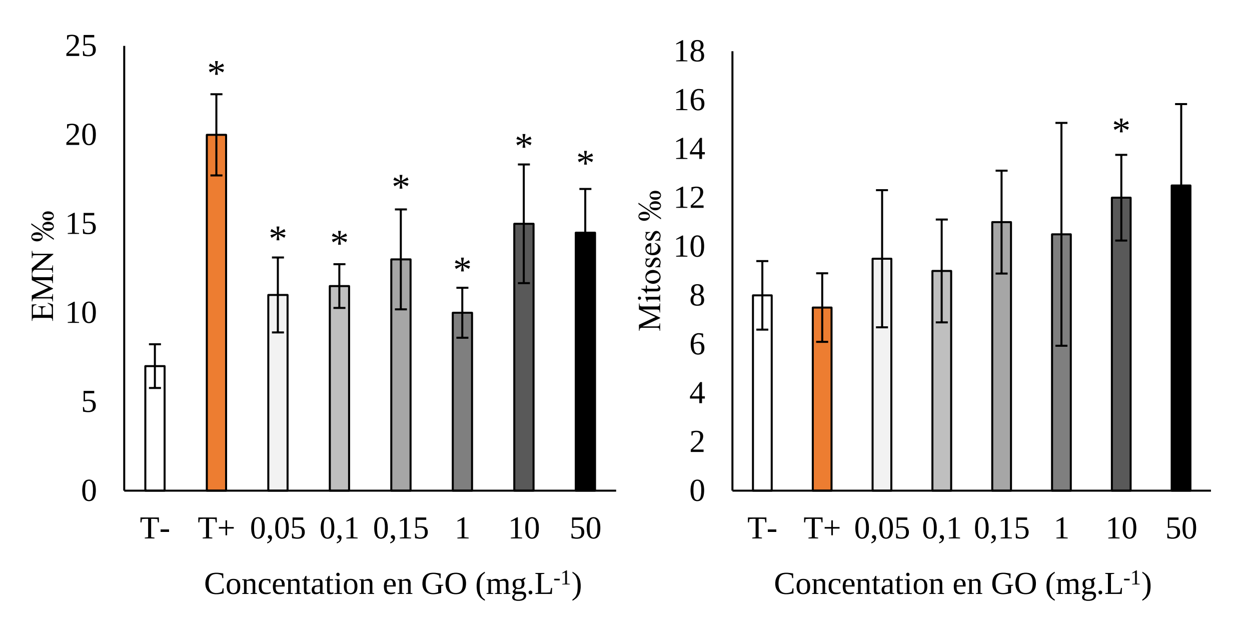


Figure 3. Génotoxicité (érythrocytes micronucléés, EMN ‰) et mitoses érythrocytaires (‰) chez *P. waltl.* après 12 jours d'exposition semi-statique au GO. « * » indique un résultat significatif par rapport au témoin négatif (T-).

Ici, il apparait que toutes les concentrations testées sont significativement génotoxiques par rapport au témoin négatif. En accord avec ces résultats, les mitoses associées ne montrent pas d'inhibition sur la gamme testée, au contraire, leur nombre tend à augmenter de manière dose-

dépendante. Le potentiel génotoxique du GO est donc clairement confirmé et l'induction de micronoyaux souligne une sensibilité accrue du pleurodèle, par rapport au xénope. Sur le plan physiologique, cela peut s'expliquer par le fait que le siège de l'érythropoïèse soit différent chez ces deux organismes. Rappelons que c'est lors de cette phase de différenciations et de divisions cellulaires qu'à lieu la formation de micronoyaux dans les érythrocytes. Alors que l'essentiel des divisions érythrocytaires a lieu dans le foie chez la larve de xénope (et finalement très peu dans le sang) (Tsiftsoglou *et al.*, 2009), les érythrocytes se développent dans le sang circulant et la rate chez la larve de pleurodèle (Flavin et Deparis, 1985). Irrigant tout l'organisme, le sang est peut-être plus facilement accessible à un polluant comme le GO si celui-ci venait à entrer par les branchies, le tractus intestinal ou la peau. Etant nourris avec des chironomes congelés non contaminés, il est possible que les pleurodèles soient moins exposés au GO via leur alimentation que ne le sont les xénopes en filtrant continuellement le milieu. Aucune inhibition de croissance par rapport au témoin n'est d'ailleurs observée. Au stade larvaire étudié, les pleurodèles n'ont pas encore développé leurs poumons (Shi et Boucaut, 1995), et ils n'utilisent que leur peau et leurs branchies pour respirer. Ces dernières, très développées et externes à l'organisme, sont particulièrement exposées au GO. D'autre part, le comportement non-filtreur des pleurodèles a pour conséquence un maintien prolongé du GO en suspension dans le milieu d'exposition. Cela implique une durée d'exposition par la peau et les branchies supérieure chez le pleurodèle exposé, comparé au xénope, à l'échelle de 24h (Figure 4).

Enfin, pour en revenir au xénope, l'étude de la génotoxicité du GO ouvre encore d'autres perspectives, et en particulier celle de l'approfondissement de la connaissance des mécanismes de toxicité impliqués. Car finalement, si nous constatons une induction des micronoyaux, quel est le véritable mode d'action de l'oxyde de graphène ? Est-il capable de perturber des fonctions métaboliques ? En étudiant les mécanismes moléculaires associés à la génotoxicité chez le xénope, le chapitre suivant tâchera d'apporter certaines réponses à ces questions à travers l'expression des gènes.

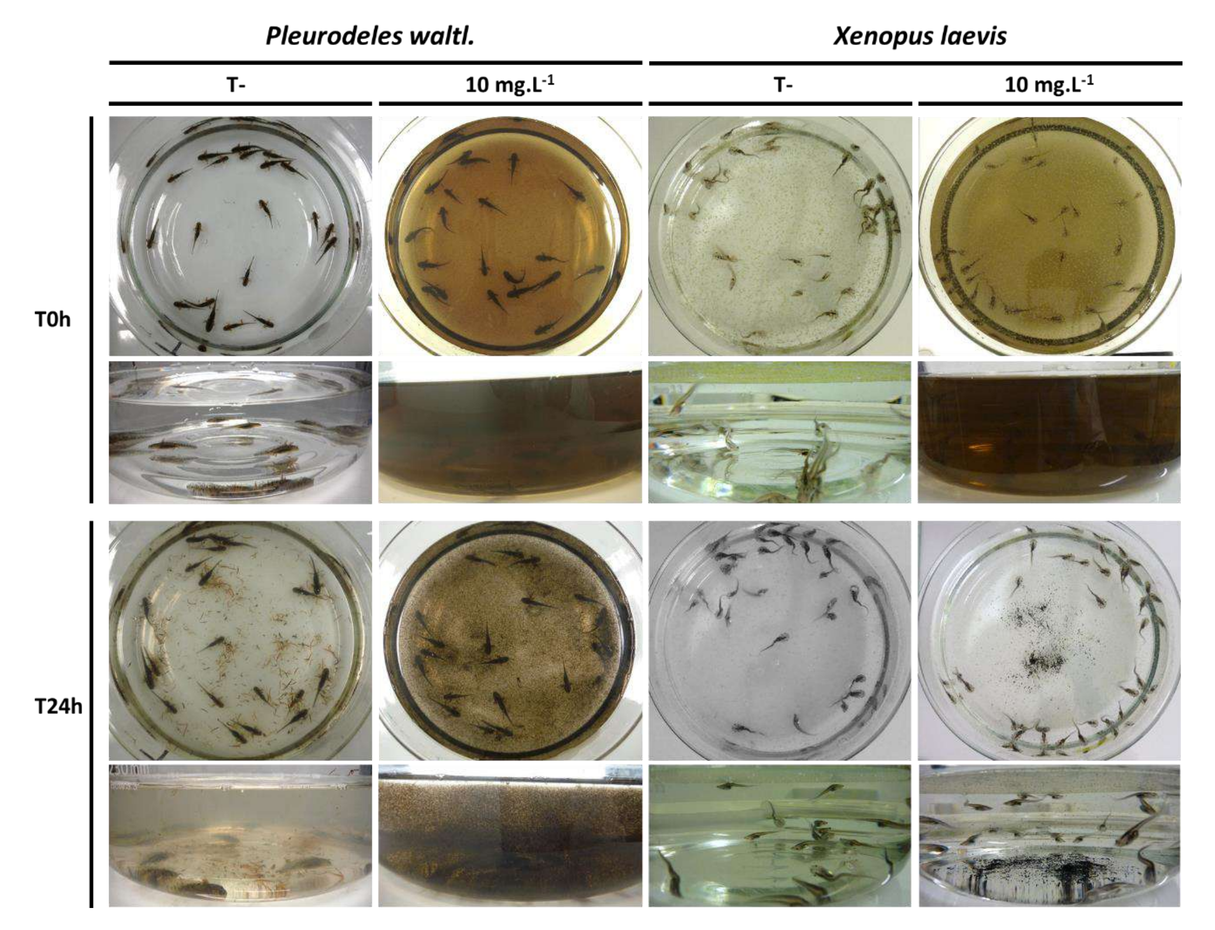


Figure 4. Photographies des milieux d'exposition des témoins négatifs et du GO à 10 $mg.L^{-1}$ vus de dessus et de côté pour *P. waltl*. et *X. laevis* au début du renouvellement du milieu (T0h) et 24h après (T24h).

Références bibliographiques

Bourdiol, F., 2013. Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien Xenopus laevis: synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage. Université de Toulouse.

Fernandes, A.L., Josende, M.E., Nascimento, J.P., Santos, A.P., Sahoo, S.K., da Silva Junior, F.M.R., Romano, L.A., Furtado, C.A., Wasielesky, W., Monserrat, J.M., Ventura-Lima, J., 2017. Exposure to few-layer graphene through diet induces oxidative stress and histological changes in the marine shrimp Litopenaeus vannamei. Toxicol. Res. (Camb). 6, 205‑214. doi:10.1039/C6TX00380J

Fernandez, M., L'Haridon, J., Gauthier, L., Zoll-Moreux, C., 1993. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. Mutat. Res. 292, 83–99.

Flavin, M., Deparis, P., 1985. Globin gene expression in erythroid cell lines during larval development of Pleurodeles waltlii. Cell Differ. 16, 203–209.

Hashemi, E., Akhavan, O., Shamsara, M., Daliri, M., Dashtizad, M., Farmany, A., 2016. Synthesis and cyto-genotoxicity evaluation of graphene on mice spermatogonial stem cells. Colloids Surfaces B Biointerfaces 146, 770–776. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.07.019

ISO 21427-1, 2006. Water Quality-Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei-Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae; International Organization for Standardization. Geneva.

Jaylet, A., Deparis, P., Ferrier, V., Grinfeld, S., Siboulet, R., 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt Pleurodeles waltl to detect mutagens in fresh-water pollution. Mutat. Res. 164, 245–257.

Liu, J., Rinzler, A.G., Dai, H., Hafner, J.H., Bradley, R.K., Boul, P.J., Lu, A., Iverson, T., Shelimov, K., Huffman, C.B., Rodriguez-Macias, F., Shon, Y.-S., Lee, T.R., Colbert, D.T., Smalley, R.E., 1998. Fullerene pipes. Science (80-.). 280, 1253–1256. doi:10.1126/science.280.5367.1253

Liu, Y., Luo, Y., Wu, J., Wang, Y., Yang, X., Yang, R., Wang, B., Yang, J., Zhang, N., 2013. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis. Sci. Rep. 3, 1–8. doi:10.1038/srep03469

McGill, R., Tukey, J.W., Larsen, W.A., 1978. Variations of box plots. Am. Stat. 32, 12–16. doi:10.2307/2683468

Mehta, A., Haber, J.E., 2014. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6, 1–17. doi:10.1101/cshperspect.a016428

Mouchet, F., 2002. Validation du test comète sur larves d'amphibiens (Xenopus laevis et Pleurodeles waltl.) et application du potentiel génotoxique de sols, sédiments et déchets contaminés : comparaison avec le test micronoyau amphibien. Université Paul Sabatier,

Toulouse, France.

Muller, J., Decordier, I., Hoet, P.H., Lombaert, N., Thomassen, L., Huaux, F., Lison, D., Kirsch-Volders, M., 2008. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. Carcinogenesis 29, 427–433. doi:10.1093/carcin/bgm243

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1956. Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. North-Holland, Amsterdam.

Paredes, J.I., Villar-Rodil, S., Martinez-Alonso, A., Tascon, J.M.D., 2008. Graphene oxide dispersions in organic solvents graphene oxide dispersions in organic solvents. Langmuir 24, 10560–10564. doi:10.1021/la801744a

Patlolla, A.K., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Patlolla, S., Tchounwou, P.B., 2010. Comparative study of the clastogenicity of functionalized and nonfunctionalized multiwalled carbon nanotubes in bone marrow cells of Swiss-Webster mice. Environ. Toxicol. 25, 608–621. doi:10.1002/tox.20621

Sanchez, V.C., Jachak, A., Hurt, R.H., Kane, A.B., 2012. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. Chem. Res. Toxicol. 25, 15–34. doi:10.1021/tx200339h

Sasidharan, A., Swaroop, S., Chandran, P., Nair, S., Koyakutty, M., 2016. Cellular and molecular mechanistic insight into the DNA damaging potential of few-layer graphene in human primary endothelial cells. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 12, 1347–1355. doi:10.1016/j.nano.2016.01.014

Shi, D.-L., Boucaut, J.-C., 1995. The chronological development of the urodele amphibian Pleurodeles waltl (Michah). Int. J. Dev. Biol. 39, 427–441.

Toyokuni, S., 2013. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. Adv. Drug Deliv. Rev. 65, 2098–2110. doi:10.1016/j.addr.2013.05.011

Tsiftsoglou, A.S., Vizirianakis, I.S., Strouboulis, J., 2009. Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. IUBMB Life 61, 800–830. doi:10.1002/iub.226

Chapitre 5

Influence du degré d'oxydation du graphène sur sa toxicité chez *Xenopus laevis* : approche moléculaire

Résumé :

De par sa production grandissante, l'oxyde de graphène (GO) est de plus en plus susceptible d'être libéré dans l'environnement. Le présent travail contribue à l'évaluation du risque lié au GO chez les espèces aquatiques en étudiant son impact chez la larve de l'amphibien *Xenopus laevis*. Sur la base de notre étude précédente portant sur l'induction de micronoyaux dans les érythrocytes du sang circulant -induction causée par le GO- les mécanismes moléculaires de toxicité sont ici approfondis. Comme le foie est le siège de l'érythropoïèse chez le xénope, et qu'il contrôle de nombreuses voies métaboliques, cet organe a été choisi pour analyser l'expression relative des gènes impliqués dans l'hypoxie, le métabolisme mitochondrial, le stress oxydatif, l'inflammation, la réparation de l'ADN, les processus de détoxification et la régulation du cycle cellulaire.

A l'exception de la réparation de l'ADN, toutes les fonctions étudiées ont montré une induction en présence de GO, en particulier à 0,1 $mg.L^{-1}$ -concentration à laquelle l'induction de micronoyaux avait été préalablement observée. Les hypothétiques voies d'action du GO sont discutées. La majeure partie de la toxicité pourrait être attribuée aux fonctions époxyde du GO. Effectivement, ces groupes fonctionnels sont éliminés lors du processus de réduction du GO, conduisant à un matériau plus sûr qui n'induit plus aucun des gènes étudiés, par comparaison au groupe contrôle.

Influence of the oxidation level of graphene oxide on its toxicity in the liver of *Xenopus laevis*: a molecular approach

L. LAGIER[1], P. GONZALEZ[2], F. MOUCHET[1*], L. EVARISTE[1], S. CADARSI[1], A. MOTTIER[1], G. DAFFE[2], P. LONCHAMBON[3,4], E. FLAHAUT[3,4], E. PINELLI[1] and L. GAUTHIER[1]

[1]EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

[2]Univ. Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, Aquatic ecotoxicology team, 33120 Arcachon, France

[3]Université de Toulouse, INP, UPS, Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), UMR CNRS 5085, F-31062 Toulouse cedex 9

[4]CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France

*Corresponding author: florence.mouchet@ensat.fr

Abstract

Due to its expanding production, graphene oxide (GO) is more and more likely to be released in aquatic environment. The present work take part in assessing the risk related to GO in aquatic species by studying its impact in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. On the basis of our previous study dealing with micronuclei induction in erythrocytes of the running blood due to GO, the molecular toxicity mechanisms are focused here. As liver is the seat of erythropoiesis and manages several metabolic pathways, this organ was chosen to analyze the relative expression levels of genes involved in hypoxia, mitochondrial metabolism, oxidative stress response, inflammation, DNA repair, detoxification processes and cellular cycle regulation. Except DNA repair, all studied functions were induced by GO, especially at 0.1 $mg.L^{-1}$, the concentration for which micronuclei induction were previously recorded. The hypothetic ways of action of GO are discussed. The main part of toxicity could be attributed to epoxide functions of GO. Indeed, these functional groups are removed by the reduction process of GO, leading to a safer material which do not induce any of the studied genes compared to the negative control.

Key words: carbon-based nanoparticle, amphibian, gene expression, low concentration, reduction process

1. Introduction

Recently isolated, graphene is a single-atom-thick sheet composed by carbon atoms densely packed into a benzene-ring structure [1]. It get strong attention of scientific community due to its unique properties [2], [3]. Materials made using graphene as a precursor could be gathered under the name of graphene family nanomaterials (GFMs) [4]. Such carbon-based nanoparticles are expected to be more and more used in industries and in products intended for consumption [5], [6]. In particular, functionalized particles such as graphene oxide (GO) open the way towards new applications yet [3], [7]. However, the fallouts of these materials need all the more to be assessed as, due to their extraordinary properties, they could also be more reactive with environment. GO should so receive particular consideration dealing with environmental risk assessment, especially in aquatic environment where it could end.

In the present work, the impact of GO is investigated *in vivo* in amphibian, which turns out to be a valuable bioindicator and a sensitive model for environmental studies [8], [9], [10]. Especially, the ecotoxicological relevance of the African clawed frog (*Xenopus laevis*), combined with its easy breeding, has already been well established through the study of primary DNA damage (comet) and micronuclei formation [11], [12], [13], [14]. Micronuclei result in lagging whole chromosome (aneugenic effect) or lagging acentric chromosome or chromatid fragments at anaphase (clastogenic effect) [15]. Such abnormalities occur during cell divisions. In a recent study [16], we demonstrated that GO induces micronuclei formation in erythrocytes of the running blood of *Xenopus* larvae. Dealing with erythrocytes, most of mitosis occur during erythropoiesis, namely in larvae liver [17]. Liver is also known to be a potential accumulator of pollutants [18] and is involved in several metabolic functions [19], [20], [21]. As putative target of toxicity induced by GO, this organ is thus focused here. Additionally, a special attention is given to GO after reduction process, since reduced graphene oxide (rGO) was previously found to have no effect on micronuclei induction [16]. The difference of oxidation level between GO and rGO is so examined here in order to deeper analyze toxicity mechanisms of these nanoparticles in *Xenopus* larvae.

GFMs can impact cells by increasing reactive oxygen species (ROS) generation, leading to oxidative stress induction [22], [23], [24]. Oxidative stress can generate cellular dysfunctions such as proteins, lipids and DNA damages [25], [26], which may in turn stimulate repair systems [27] or apoptosis [28]. The ability of cells to defend against oxidative stress consists in inducing anti-oxidant systems including notably enzymes such as superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase [29]. Some studies report that GFMs can also influence detoxification processes [30], [31]. Detoxification could be divided into three phases: the phase I process is an oxidative reaction occurring mainly through the cytochrome P450 family [32]. The phase II process consists in conjugating biomolecules (*via* glutathione-S-transferase, for instance) to a pollutant or to phase I metabolites in order to make them more hydrophilic and to facilitate their excretion [33]. The phase III corresponds to the excretion of metabolites from the cells thanks to membrane proteins, such as ATP binding cassette transporters [34].

In order to assess the genetic effects of GFMs exposure in liver of *Xenopus* larvae, we selected 21 genes encoding for proteins involved in mitochondrial metabolism, anti-oxidant defenses, inflammation, detoxification, DNA repair, cellular cycle regulation, and hypoxia. Two genes were chosen to study the mitochondrial metabolism: the cytochrome C oxidase subunit I (*cox1*) and the mitochondrial small ribosomal RNA (*12s*). Response to oxidative stress were investigated through mitochondrial and cytoplasmic superoxide dismutases (*sod(Mn)* and *sod(Cu/Zn)*, respectively), catalase (*cat*) and glutathione peroxidase I (*gpx1*). Five other genes involved in inflammation were used: peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*pparγ*), cyclo-oxygenase 1 and 2 (*cyclo1* and *cyclo2*), leukotriene A4 hydrolase (*lta4h*) and arachidonate 5-lipoxygenase (*5-lox*). The detoxification metabolism was studied through

three genes: cytochrome P450 family 1 subfamily a member 1 (*cyp1a1*), glutathione S-transferase (*gst*) and a gene belonging to the ABC transporter family (*tap)*. Four genes involved in cellular cycle regulation were selected: tumor protein (*p53*), apoptosis regulators (*bcl2*, *bax*), and erythropoietin (*epo*). DNA damage repair was evaluated thanks to the expression levels of three other genes: recombinase (*rad51*), protein homolog 1 (*mutl*) and ornithine decarboxylase (*odc*). Hypoxia was also assessed through the expression of the hypoxia-inductible factor 1, alpha subunit gene (*hif1α*). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*), the elongation factor 1 alpha (*ef1α*) and the beta-actin (*βactin*) were used as reference genes due to their constitutive expression.

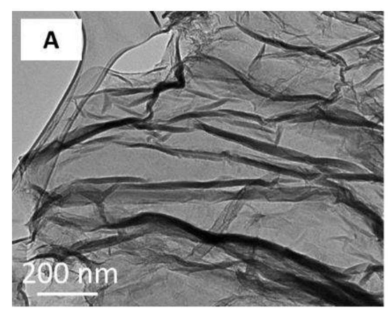
On the base of our previous work dealing with genotoxicity (micronucleus formation in erythrocytes) in *Xenopus laevis* larvae after exposure to GO or rGO [16], the present paper aims to investigate the molecular mechanisms at gene level occurring in liver -site of erythropoiesis- and which may corroborate micronuclei formation. This work is the first to investigate the effects of a carbon-based nanoparticle at molecular level in amphibian.

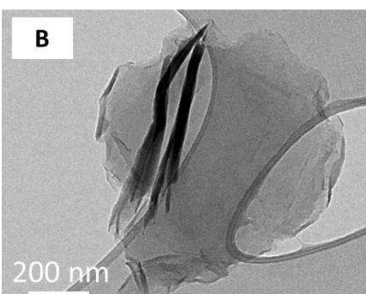
2. Materials and methods

2.1. Synthesis and characterization of graphene samples

GO (nxGOH_37B) was provided by Antolin Group and prepared by oxidation of GANF® (Grupo Antolin Carbon Nanofibers) using the Hummer's method [35], [36]. Some metal catalysts were used during GO synthesis, including nickel (Ni), iron (Fe), cobalt (Co) and molybdenum (Mn). The purity of GO powder was checked as previously described [16]. Briefly, residual metal content of the samples were measured by ICP AES, iCAP™ 6300 analyzer (Thermo Fisher Scientific) after mineralizing GO powder [37]. The total metal content corresponds to less than 16.5 $\mu g.L^{-1}$ in medium at the highest tested concentration. Similarly, PAHs which could be associated to GO during its synthesis were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry according to the normalized procedure NF ISO 28540 (MicroPolluants Technologie S.A., France). Their total amount is at least $2.5.10^{-5}$ $\mu g.L^{-1}$ in medium at the highest tested concentration. The reduction process of GO involved treatments at 200°C and 1000°C in H_2 atmosphere with a hydrogen flow rate of 5 $L.h^{-1}$ to lead to reduced graphene oxides with respectively 16.2 (rGO200) and 1.5 at.% of oxygen (rGO1000), while GO oxygen content was 30.7 at.%. Carbon content of GO, rGO200 and rGO1000 were respectively 69.3, 83.8 and 98.5 at.%. Elemental analysis (percentage of O and C atoms; at.%) were performed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis [16]. The morphology of each GFM is given by transmission electron micrographs presented in Figure 1.

Lateral size of each tested GFM was assessed by transmission electron microscopy (TEM) from 0.2 to 8 µm, with no difference between GO and rGOs. Moreover, the number of layers determined by high resolution TEM (HRTEM) was estimated from 1 to 5 for each sample [38], [39]. Specific surface areas were measured using the Brunauer, Emett and Teller's method (BET) (N_2 adsorption) [40] on powdered samples of GFMs, and was 206, 16 and 175 $m^2.g^{-1}$ for GO, rGO200 and rGO1000, respectively.





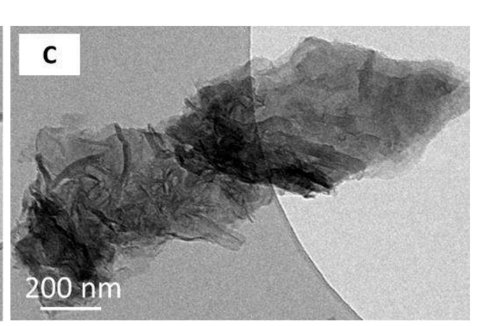


Figure 1. Transmission electron microscopy micrographs of (A) GO, (B) rGO200, (C) rGO1000.

2.2. Graphene samples preparation and contamination of the exposure media

As previously described [16], GFMs samples were physically dispersed before contaminating the exposure media. Briefly, the desired quantity of graphene powder was first weighed and dispersed in deionized water to obtain a stock suspension (5 $mg.mL^{-1}$). Then, depending on the desired concentration, required amounts of this stock suspension were sampled under ultrasonic bath (Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 kHz) and introduced in individual glass test tubes. For each concentration, 12 test tubes were thus prepared, corresponding to the number of exposure days. Afterwards, just before contaminating the water column, the suspensions of graphene were dispersed for 2 minutes in an ultrasonic bath. Finally, they were poured in crystallizing dishes and the test tubes were rinsed twice with reconstituted water (RW) [13] to collect remaining GFMs on the tubes walls. Crystallizing dishes were finally leveled to 2L with RW before introducing the organisms.

2.3. *Xenopus* rearing and breeding

Xenopus rearing and breeding were described by Mouchet *et al*. (2008) [41]. Briefly, eggs were obtained after hormonal injection of a *Xenopus* couple and maintained in normal tap water filtered through active charcoal. Then, larvae were fed with dehydrated aquarium fish food (Tetraphyll®) until they reach the desired experimental stage (stage 50 of the *Xenopus* development table [42]).

2.4. Exposure conditions

Exposure conditions are described by Mouchet *et al*. (2010) [13]. Briefly, *Xenopus* were exposed 12 days in semi-static conditions (daily water renewal) at 22 ± 1°C according to the international standard 21427-1 [43] in RW. Twenty larvae per condition were exposed in crystallizing dishes to RW alone (negative control; NC) and to experimental media (RW added with GFMs). A concentration range from 0.1 to 10 $mg.L^{-1}$ of GO was tested on *Xenopus*. Then, the effect of rGO1000 and rGO200 was investigated at 0.1 $mg.L^{-1}$. Whatever the condition, pH of the media was around 7 ± 1 in compliance with the international standard 21427-1 [43].

2.5. Total RNA extraction and purification

At the end of the exposure, *Xenopus* were anesthetized (MS222, Sandoz, France) and dissected. Their livers were each sampled and immediately immerged in RNAse-free microtubes containing 300µL RNA Later (Qiagen). Then samples were stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA were extracted from 15 to 25mg liver using the SV Total Isolation System kit (Promega) according to manufacturer's instructions and previously described by Mouchet *et al*. (2015) [44].

Total RNA concentration was determined by spectrophotometry. The purity of the samples was checked by the absorbance ratio 260/280nm on a microplate spectrophotometer (BioTek™ Epoch™ R). Five replicates of each exposure condition were realized.

2.6. Reverse transcription

Reverse transcription was carried out from 1µg of total RNA using the GoScript™ Reverse Transcription System kit (Promega) according to manufacturer's instructions. The cDNA obtained were stored at -20°C until their use for qPCR.

2.7. Primer design

For some studied gene, specific primers pairs were previously described [44]. For the remaining genes, nucleotide sequences were obtained from the online NCBI Nucleotide database and primer pairs were determined using the Primer3Plus software. All the primer pairs used are reported in Table 1. Primers were purchased from Sigma-Aldrich (Easy Oligo™). Total efficiencies of each primer pair was determined and was above 95%.

Table 1. Assession numbers, functions and primer pairs ([a]Upstream primer; [b]Forward primer) for the 25 *X. laevis* genes studied.

Functions	Gene name	Accession number	Primer (5'-3')
Oxidative stress response	*gpx1*	NM_001095427	CTACCTGACCCTCCCCAAAC[a] TTACCAACACCTGCCCTCA[b]
	cat	EF070606	GAGCAAGCGGAGAGATTCAA[a] AGCACCAGTTTACCCACAGG[b]
	sod(Cu/Zn)	X51518	GTGTGCTGGCGGGAAG[a] CCGGGGCTCCGTGATT[b]
	sod(Mn)	AY362041	TGTCAGTTGGAGTCCAGGG[a] AGTTGATAACATTCCAGATCGCTTT[b]
Inflammation processes	*pparγ*	M84163	AAAGACGGGGTGCTCGTAG[a] TGAAGTCGGAGAAGGGTTTG[b]
	cyclo1	AB278691	GGATGGGACGGGGTTTCATT TCCTGCCCTACTGCGAATTG
	cyclo2	NM_001093477	GGCCATGGGGTTGATCTCAA[a] CTGGAACATGGGGTGGGTAC[b]
	lta4h	NM_001091767	TTGTTACCCCAACTGTGCTG[a] GTTTTCCCAGGTTTCATTCG[b]
	5-lox	BG656985	AGTCAGCACGCAGTTGTGAA[a] ACACAACTCCAAGGTGCCAG[b]
Hypoxia	*hif-1α*	NM_001172184	CAGTCTCTTTCGCCATCCAC[a] AACTTGTGCGGCTTCTGTTT[b]
Cell cycle regulation	*bax*	AY437085	AAGCAAGGGGAAGGCG[a] CGGGTCACTCTGTTGGG[b]
	bcl2	NM_001146093	AACCCCATCCACAGTTAGGG[a] GCAACAATCCTTCCCCAGT[b]
	p53	M36962	TCATGTGCTGTCCCCTCAAC[a] TCGGCCACATGCTCAGATTT[b]
	epo	NM_001197281	CACTCCAAACATCCAATACGG[a] TCGTTGACCTCTCTGCTTCC[b]
Mitochondrial metabolism	*cox1*	M10217	CCGGAGGAGGTGACCC[a] CTCAGACAATAAAGCCTAGAATCCA[b]
	12s	M10217	ACGCAAAAATCCGCCAGAAC[a] GGCGACGGTGGTATATAGGC[b]
DNA repair	*rad51*	BC108486	TCAAGAAACTGGAGGACGCC[a] CGCCTCTGGTGAAACTCAGT[b]
	mutl	BE681219	TATGAGGACTGAGAAAACAGAAGCA[a] AGTTACAAACACTTGGAGCTGAT[b]
	odc	NM_001086698	TCAGGAGAGCGGAATGGA[a] GGTCCCAAGGCTAAAGTTGC[b]
Detoxification	*cyp1a1*	NM_001097072	TGCTGAATGTTTCCTGGGAGT[a] CCCCTTGCACTTTTGGTTCC[b]
	tap	AY204551	TTGCTGTCGGTGGGGC[a] CAGTGTTGATTCGGTGGG[b]
	gst	AJ489617	CGTCCTCACCTATTTCCCCG[a] CCTGAAACTGAGGCAGCTGA[b]
References	*gapdh*	NM_001087098	ACCCAGAAGACAGTGGATGG[a] CAGTTGAGGCGGGAATAATG[b]
	B actin	BE490926	ATTGAGCCACCAATCCAGG[a] ACAAGTGTTGGAATGTGCG[b]
	ef1α	NM_001101761	AAGGGAACACGCTCTTCTGG[a] TATTCTCTCCCGTCCAGCCA[b]

2.8. Real-time qPCR

Real-time qPCR were carried out using GoTaq® qPCR Master Mix kit (Promega) on five samples per condition. PCR reactions contained 17 µL of a mixture of Nuclease-Free Water and GoTaq® qPCR Master Mix containing the SyberGreen fluorescent dye, 2 µL of specific primer pairs mix (200 µM each) and 1µL of cDNA. Real-time quantitative PCR reactions were performed in a Mx3000P® qPCR System (Stratagene). The amplification program consisted in one cycle at 95°C for 10min, then 45 amplification cycles at 95°C for 30s, 60°C for 30s and 72°C for 30s. Specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. This dissociation curve was obtained by following the SYBR Green fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95°C.

Cycle thresholds (Ct) were obtained from MxPro™ qPCR software for each gene. Three different reference genes were investigated: *β actin*, *gapdh*, *ef1α*. Among them, only *β actin* and *gapdh* were evidenced to be stable in our conditions. Consequently, relative quantification of each gene expression level was normalized according to the mean Ct value of these two reference genes according to the 2ΔCt methods described by Livak and Schmittgen (2001) [45]. Induction factors, compared to control group, were then determined as previously described [46].

One-way ANOVA on ranks and Tukey post-hoc test ($p < 0.05$) were used to statistically compare differential gene expression levels of *Xenopus* exposed to contaminated media to negative control. Statistical analysis were performed using SigmaPlot 12.0 software.

3. Results

3.1. Genes expression in livers of *Xenopus* exposed to GO

In *Xenopus* larvae liver, analyze of the relative gene expression levels after 12 days of exposure to GO reveals a significant induction of numerous studied genes, especially at the lowest concentration (Table 2). Indeed, at 0.1 $mg.L^{-1}$, except DNA repair, all studied functions were impacted by exposure to GO. Some genes involved in oxidative stress response (*gpx1*, *sod(Cu/Zn)* and *sod(Mn)*) were significantly induced (from 2.48 to 5.84 times more than the negative control). Some markers of inflammation were also induced by GO at 0.1 $mg.L^{-1}$ such as *pparγ*, *5-lox* and *cyclo1*. The gene *hif-1α* shows a significant induction at each tested concentration. Cell cycle regulation were also impacted by GO at low concentration (induction of *bax*, *bcl2* and *p53*). Mitochondrial metabolism was overexpressed compared to the NC: *cox1* and *12S* were both induced (4.01 and 4.48 times more than the NC, respectively). Finally, some detoxification processes occurred as shown by the induction of *cyp1a1* and *tap* at 0.1 $mg.L^{-1}$.

3.2. Genes expression in livers of *Xenopus* exposed to rGOs

Relative genes expression after 12 days of exposure to each rGO (rGO1000 and rGO200) did not exhibit any significant differential gene expression levels at 0.1 $mg.L^{-1}$ compared to the negative control (Table 3).

4. Discussion

In our previous study, graphene oxide was found to be responsible for micronuclei induction in erythrocytes of *Xenopus* larvae [16]. A micronucleus formation occurs necessarily during a cellular division. However, the number of mitotic erythrocytes in the running blood appeared too low to offer the probability to observe the amount of micronucleated erythrocytes we got. This suggested that main genotoxicity mechanism occurs when cells divided actively, namely during erythropoiesis (the process leading to erythrocytes formation from erythroid precursors). Even if the location of erythropoiesis at the studied larval stage may vary among tadpoles during prometamorphosis [17], [47], erythropoiesis would essentially take place in the liver according to our previous results [16]. This suggests that liver could be impacted by graphene oxide (directly or indirectly).

On the base of these findings, in order to deeper analyze toxicity mechanisms induced by GO in liver of *Xenopus laevis* tadpole, the present work aims at assessing the impact of this nanoparticle at the molecular level. Liver is known to monitor several important biochemical pathways. Notably, since the main metabolic reactions of detoxification take place in this organ, this is also the preferential location for collateral events [19], such as oxidative stress, inflammation, cellular cycle regulation and DNA repair. Thus, we chose to study these functions through the relative expression levels of *Xenopus* genes.

4.1. GO effect at low concentration: toxicity due to bioavailability?

Firstly, the relative genes expression presented in Table 2 exhibits a significant induction of *hif1α* at each tested concentration, suggesting that exposure to GO causes hypoxia. This result is in compliance with previous macro-observations of GO agglomerates in *Xenopus* larvae gills, which were assumed to lead to respiratory disturbances [48]. In addition, *hif1α* shows highest over-expression at the lower concentration of GO (0.1 $mg.L^{-1}$), which could be attributed to prolonged bioavailability of GO in the water column. Indeed, GO at higher concentrations was shown to sediment faster, leading to a shorter contact time with larvae in water column [16]. The rate of aggregation between GO nanoparticles is supposed to increase with concentration, leading to less bioavailable isolated GO. In line with this hypothesis, the induction of *epo* at 0,1 $mg.L^{-1}$, which is hypoxia-inducible [49], should lead to an enhanced production of red blood cells. Similarly, most studied genes exhibited significant differential expression at 0.1 $mg.L^{-1}$, rather than at higher concentrations, compared to the negative control.

Table 2. Differential gene expression in *Xenopus* larvae liver (n = 5) after 12 days of exposure to GO. For each condition, results are given as induction (>1) or repression (<1) factors compared to the negative control. Only statistically significant values are given; "-" indicates factors similar to control levels.

Functions	**Genes**	**Genes relative expression**		
		GO 0.1 $mg.L^{-1}$	**GO 1 $mg.L^{-1}$**	**GO 10 $mg.L^{-1}$**
Oxidative stress response	*gpx1*	5.84	3.96	-
	cat	-	-	-
	sod(Cu/Zn)	2.76	-	-
	sod(Mn)	2.48	-	-
Inflammation processes	*pparγ*	5.71	-	-
	cyclo1	3.65	-	-
	cyclo2	-	-	-
	lta4	-	-	-
	5-lox	2.60	-	-
Hypoxia	*hif-1α*	7.38	6.10	6.93
Cell cycle regulation	*bax*	4.19	-	-
	bcl2	5.21	-	-
	p53	3.67	-	-
	epo	4.82	-	-
Mitochondrial metabolism	*cox1*	4.01	-	-
	12S	4.48	-	-
DNA repair	*rad51*	-	-	-
	mut	-	-	-
	odc	-	-	5.84
Detoxification	*cyp1a1*	4.99	-	-
	tap	19.09	-	-
	gst	-	-	-

Table 3. Differential gene expression in *Xenopus* larvae liver (n = 5) after 12 days of exposure to 0.1 mg.L^{-1} of rGO200 or rGO1000. Results are given as induction (>1) or repression (<1) factors compared to the negative control. "-" indicates factors similar to control levels.

Functions	**Genes**	**Genes relative expression**	
		rGO200 0.1 mg.L^{-1}	**rGO1000 0.1 mg.L^{-1}**
Oxidative stress response	*gpx1*	-	-
	cat	-	-
	sod(Cu/Zn)	-	-
	sod(Mn)	-	-
Inflammation processes	*pparγ*	-	-
	cyclo1	-	-
	cyclo2	-	-
	lta4	-	-
	5-lox	-	-
Hypoxia	*hif-1α*	-	-
Cell cycle regulation	*bax*	-	-
	bcl2	-	-
	p53	-	-
	epo	-	-
Mitochondrial metabolism	*cox1*	-	-
	12S	-	-
DNA repair	*rad51*	-	-
	mut	-	-
	odc	-	-
Detoxification	*cyp1a1*	-	-
	tap	-	-
	gst	-	-

4.2. Toxicity of GO: direct or indirect mechanisms? – A comparison to rGO

Turning to the impact of GO on mitochondrial metabolism, *cox1* and *12S* are both over-expressed at 0.1 mg.L^{-1}. The ratio between their induction factors is near to one, which indicates that the activity of a given mitochondria is not influenced but that the mitochondrial network increases. Consequently, ATP production is enhanced, suggesting needs for cells to fight against damages caused by GO [50]. On the other hand, working mitochondria are likely to generate reactive oxygen species (ROS) [51], which could in turn induce antioxidant defense system [52]. Within mitochondria, the induction of *sod(Mn)* attests that oxidative stress occurs. In addition, the induction of the cytoplasmic super-oxide dismutase (*sod(Cu/Zn)*) confirms that exposure to GO leads to significant oxidative stress induction in larvae. Similarly, many studies agree that GO is responsible for oxidative stress both *in vitro* and *in vivo* [53], [54], [23], [55], [22]. Super-oxide dismutases aim at converting superoxide radical in hydrogen peroxide in order to reduce its toxicity. However, H_2O_2 is still toxic for cells and should be eliminated. Here, *cat* is not induced compared to basal expression, unlike *gpx* which shows that glutathione way is favored to remove H_2O_2. Furthermore, oxidative stress induced by GO is generally concomitantly observed with the induction of inflammation [56], [57], [58]. Results of the present work exhibit an induction of *pparγ* corresponding to these phenomena at 0.1 mg.L^{-1} of GO. The up-regulation of *5-lox* also suggests that inflammation is mediated by leukotrienes, while the enzyme encoded by this gene (5-lipoxygenase) might be a cause of tumorigenesis [59]. However, *lta4,* which encodes for an enzyme involved in the final step of leukotriene B4 biosynthesis, is not significantly induced by GO exposure. This

suggests that inflammatory response is relatively moderated. Although its expression is usually considered as constitutive, *cyclo1* is over-expressed. Nevertheless, it has been demonstrated that *cyclo1* is inducible in some cases, including tumor formation that it could indirectly promote [60]. On the contrary, another gene encoding for an isoform of cyclooxygenase, *cyclo2*, is not induced, although it corresponds to the deemed inducible isoform of the enzyme [61]. This lack of effect for *cyclo2* is not well understood yet and requires further elucidation of the complex biosynthetic cascade in witch cyclooxygenases take part in *Xenopus* larvae.

Interestingly, oxidative stress and other functions described above are no more induced in *Xenopus* exposed to reduced graphene oxides (Table 3), suggesting that GO reduction provides safer nanoparticles for pelagic larvae, from thermal treatment at 200°C (rGO200). Similarly, GO was shown to lose its genotoxic potential towards *Xenopus* erythrocytes after reduction. These biological responses (genes induction and micronuclei formation) could be mainly related to the oxygen functions of GO, which are removed during the reduction process [16]. Notably, GO contains epoxides which are well known for their ability to form DNA adducts leading to mutagenesis [62], [63], [64]. This would suggest that GO could enter into *Xenopus* cells and directly exercise its toxicity towards nucleic acids. However, GO may also take part in generation of oxidative stress which could indirectly cause DNA damages [57], [65]. Marnett (2000) [64] reviews that DNA damages could arise from endogenous cellular sources such as intermediates of oxygen reduction, but also reactive intermediates resulting from lipid peroxidation that may couple to DNA bases. Consequently, GO toxicity could be due to direct (GO itself) and/or indirect effects (mediated by ROS). A study reports that *Xenopus* exposed to multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) display high induction of oxidative stress in erythrocytes [14]. Even if DNA damages appeared after short term exposure to MWCNTs (measured by comet assay), no micronuclei induction was reported in this study, which highlights that oxidative stress is not necessarily responsible for genotoxicity after 12 days exposure. Thus, the fact that GO induces micronuclei formation could be an argument in favor of direct effect of the nanoparticle, even if no result to date has provided a clear-cut answer to this question.

Concerning detoxification processes, Table 2 indicates that *cyp1a1* is induced at 0.1 $mg.L^{-1}$ of GO. Even if phase I metabolism in which *cyp1a1* is involved is ordinarily devoted to organic pollutants, some carbon-based nanoparticles can also be responsible for changes in the activities of CYP450 isoforms [66], [67]. Here, GO demonstrates ability to induce *cyp1a1*, whereas *Xenopus* larvae exposed to rGOs do not reveal any significant change in the expression level of this gene (Table 3). The potential degradation of GO by CYP450 1A1 could so occur, leading to suspicion of this nanoparticle direct effect in larvae cells. As suggested by Vlasova *et al*. (2016) [68], this needs for an in-depth analysis since P450 metabolism of xenobiotics may generate highly reactive compounds that could be in turn at the origin of cellular damages, including oxidative stress. However, although PAHs impurities of GO were not considered sufficient to generate micronucleus formation [16], their eventual impact may not be excluded here due to the high sensitivity of molecular response. Indeed, PAHs are well known to induce phase I metabolism [69]. On the other hand, detoxification process of phase I may be coupled with phase II metabolism, consisting in conjugating a compound like glutathione to a functional group of a pollutant to make it easier to eliminate [33]. However, *gst*, encoding for glutathione-S-transferase (GST), does not show different expression after GO exposure compared to the control group. Nevertheless, *gst* expression was highly variable between replicates, with larvae expressing either high induction or high repression of the gene (until 8.40 times more, and until 16.6 times less than the negative control, respectively). Since liver contains limited quantities of glutathione [70], the *gst* repression might suggest a total consumption or a deficient renewal of glutathione stock in some individuals, whereas other larvae highly induced detoxification

involving *gst*. Literature reports mixed results concerning change in activity of GST in presence of GFMs [71]. Fernandes *et al*. (2016) [72] observed modulated activity of GST depending on the sample organ of shrimps exposed to few-layer graphene. However, authors highlight that positive modulation of GST activity expends reduced glutathione and leaves the tissue more vulnerable to pro-oxidant conditions, while negative modulation of GST activity would affect the detoxification capacities, leading to an accumulation of toxic compounds. Otherwise, *tap*, which encodes for an ABC transporter located in the membrane of the endoplasmic reticulum, is induced in presence of GO at low concentration. This attests that cellular detoxification happens by expulsing toxic compounds which are conjugated with glutathione (for instar) from the cells.

4.3. No induction of DNA repair by GO: a missed response?

GO could have direct and/or indirect toxicity towards hepatocytes. In any event, GO should be expected to induce DNA repair since chromosomal damages were previously observed [16]. But surprisingly, *rad51*, *mut* and *odc* showed no differential expression at 0.1 $mg.L^{-1}$ of GO compared to negative control (Table 1). The gene *odc* encodes for ornithine decarboxylase, which is involved in polyamines biosynthesis. These molecules play multiple essential roles, including stabilizing DNA structure [73]. As *odc* is naturally expressed in cells, at 0.1 $mg.L^{-1}$ of GO, its physiologic rate of expression could be sufficient to repair the induced damages. However, the induction of *odc* at 10 $mg.L^{-1}$ of GO would reflect a greater need for polyamines. Then, *rad51* and *mut* are currently induced in case of homologous recombination [74] or single-strand DNA breaks [75]. Thus, DNA damage might be limited to aneugenic effects or else to double-strand DNA breaks which do not require homologous recombination. Such events could result from eventual DNA adducts [76], [77]. For instance, non-homologous end-joining, which mediates the direct religation of the broken DNA molecule [78], does not require a homologous template for repair the DNA lesion, but enzymes involved in DNA double-strand breaks repair pathways such as DNA-PKcs, Ku70, Ku80 and XRCC4 [79], [80]. All existing DNA repair genes were not investigated in the present study, whereas those encoding for the previous enzymes could have supported or invalidated the apparent absence of DNA repair. On the other hand, DNA damages could show fluctuations over time in relation with continuous balance between damages and compensation processes [81], but also because of semi-static conditions of exposure. More precisely, genes expression is evaluated at the end of exposure, i.e. after 12 days of exposure to GO and 24 hours after the last water renewal. In respect with the GO dispersion dynamics in the medium over 24 hours as described by Lagier *et al.* (2017) [16], that means results of genes expression correspond to the moment where most of GO is agglomerated, defecated and settled down to the bottom of the crystallizing dish [82], [48]. On the assumption that GO (especially GO under isolated, non-agglomerated form) is mainly bioavailable for larvae when it is dispersed in water column, GO could exercise mostly of its toxicity towards DNA in the first hours of daily water renewal. As highlighted by Liu *et al* (2013) [53] in mice, *rad51* expression is often observed at the beginning of DNA damage but is transient: it returns quickly to its normal level thereafter GO injection. Thus we can hypothesize that the same phenomenon occurred in our experimental conditions and that the sampling time did not allowed to observe the rapid response of repair mechanisms.

Despite the apparent absence of defense systems activation by cells, the cellular cycle is impacted by the exposure to the lowest concentration of GO (Table 1). Notably, *p53* induction suggests that cellular cycle is stopped in order to allow either reparation of damages, or apoptosis whether reparation would fail [83]. As enounced above, no DNA repair seems to be induced. The way of apoptosis would so be implied. Regarding genes expression relative to apoptosis, there is an ambivalence between the simultaneous induction of pro (*bax*) and anti-apoptotic genes (*bcl2*). This could be related to

the complex cellular set in which gene expression is studied [21], which would mean that some cells try to survive whereas another part dye. In addition, it is worth mentioning that the organism of *Xenopus* larvae is in constant evolution due to metamorphosis, which involves degeneration of the larval cells through apoptosis and concurrent proliferation and differentiation of adult cell types [84].

5. Conclusion

Although the methodology used in this study to evaluate DNA damage was not specific for identifying the kind of action (direct or indirect) of GO, the gene expression levels were evaluated in the same direction as micronuclei formation concerning oxidative stress response, detoxification, cell cycle regulation, inflammation and mitochondrial metabolism. The observed genes inductions at low concentration could be essentially attributed to oxygen functions (especially epoxides) of GO and to oxidative stress generation since no effect was recorded after exposure to rGO. DNA repair was the only function that shown no induction after GO exposure, compared to the control group. Gene expression is a more ephemeral endpoint than micronucleus, which could give many perspectives to this work. Thus, further investigation should be undertaken on genes expression kinetic in *Xenopus* larvae over 24 hours in the same conditions of exposure to GO.

Then, genes expression patterns could vary depending both on the sampled organ and the development stage of *Xenopus laevis* [85]. Nowadays, detecting and localizing GFMs in biological complex matrices is still a challenge. Otherwise, in view of improve the understanding of GO impact *in vivo*, exploring the other potential impacted larval organs would allow to overlap the genetic data of liver. While liver is essentially related to what is ingested, other ways of contamination could be analyzed such as gills or skin, which is very permeable [18]. Similarly, an enzymatic approach could supplement this study.

Acknowledgments

This research was supported by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research. The research has also received funding from the European Union Seventh Framework Programme under grant agreement n°604391 Graphene flagship.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

References

[1] K. S. Novoselov *et al.*, « Electric field effect in atomically thin carbon films », *Science (80-.).*, vol. 306, p. 666-669, 2004.

[2] V. Georgakilas, J. A. Perman, J. Tucek, et R. Zboril, « Broad family of carbon nanoallotropes: classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures », *Chem. Rev.*, vol. 115, nº 11, p. 4744-4822, 2015.

[3] Y. Zhu *et al.*, « Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications », *Adv. Mater.*, vol. 22, nº 35, p. 3906-3924, 2010.

[4] A. Bianco *et al.*, « All in the graphene family - A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials », *Carbon N. Y.*, vol. 65, p. 1-6, 2013.

[5] A. K. Geim et K. S. Novoselov, « The rise of graphene », *Nat. Mater.*, vol. 6, p. 183-191, 2007.

[6] A. K. Geim, « Graphene: status and prospects », *Science (80-.).*, vol. 324, p. 1530-1534, 2009.

[7] J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martinez-Alonso, et J. M. D. Tascon, « Graphene oxide dispersions in organic solvents graphene oxide dispersions in organic solvents », *Langmuir*, vol. 24, nº 19, p. 10560-10564, 2008.

[8] A. Jaylet, L. Gauthier, et C. Zoll, « Micronucleus test using peripheral red blood cells of amphibian larvae for detection of genotoxic agents in freshwater pollution », in *In situ evaluation of biological hazards of environnemental pollutants*, Springer US, 1990, p. 71-80.

[9] L. Gauthier, « The amphibian micronucleus test, a model for in vivo monitoring of genotoxic aquatic pollution », *Alytes, Int. J. Batrachology*, vol. 14, nº 2, p. 53-84, 1996.

[10] V. Ferrier, L. Gauthier, C. Zoll-Moreux, et J. L'Haridon, « Genotoxicity test in amphibians-a review », *Microscale Test. Aqat. TOxicol. Adv. Techn. Pr. 35, 507-519*, vol. 35, p. 507-519, 1998.

[11] F. Mouchet, L. Gauthier, C. Mailhes, M. J. Jourdain, V. Ferrier, et A. Devaux, « Biomonitoring of the genotoxic potential of draining water from dredged sediments, using the comet and micronucleus tests on amphibian (Xenopus laevis) larvae and bacterial assays », *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A*, vol. 68, nº 10, p. 811-832, 2005.

[12] F. Mouchet, L. Gauthier, C. Mailhes, V. Ferrier, et A. Devaux, « Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (Xenopus laevis) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay », *Environ. Toxicol.*, vol. 20, nº 1, p. 74-84, 2005.

[13] F. Mouchet, P. Landois, P. Puech, E. Pinelli, E. Flahaut, et L. Gauthier, « Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes », *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 5, nº 6, p. 963-974, 2010.

[14] R. Saria *et al.*, « Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles », *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 107, p. 22-29, 2014.

[15] M. Fenech *et al.*, « Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells », *Mutagenesis*, vol. 26, nº 1, p. 125-132, 2011.

[16] L. Lagier *et al.*, « Removal of genotoxicity of graphene oxide in vivo: towards an environmentally safe-by-design approach », 2017.

[17] A. S. Tsiftsoglou, I. S. Vizirianakis, et J. Strouboulis, « Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs », *IUBMB Life*, vol. 61, nº 8, p. 800-830, 2009.

[18] K. L. Smalling *et al.*, « Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture », *Sci. Total Environ.*, vol. 502, p. 80-90, 2015.

[19] M. G. Sturgill et G. H. Lambert, « Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function », *Clin. Chem.*, vol. 43, nº 8(B), p. 1512-1526, 1997.

[20] C. Regnault *et al.*, « Impaired liver function in Xenopus tropicalis exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence », *BMC Genomics*, vol. 15, nº 1, p. 1-16, 2014.

[21] G. J. Crawshaw et T. K. Weinkle, « Clinical and pathological aspects of the amphibian liver », *Semin. Avian Exot. Pet Med.*, vol. 9, nº 3, p. 165-173, 2000.

[22] M. Chen *et al.*, « Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish », *Aquat. Toxicol.*, vol. 174, p. 54-60, 2016.

[23] M. Zhang, Q. Yu, C. Liang, Z. Liu, B. Zhang, et M. Li, « Graphene oxide induces plasma membrane damage, reactive oxygen species accumulation and fatty acid profiles change in Pichia pastoris », *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 132, p. 372-378, 2016.

[24] S. Gurunathan, J. W. Han, A. A. Dayem, V. Eppakayala, et J.-H. Kim,

« Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in Pseudomonas aeruginosa », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, p. 5901-5914, 2012.

[25] A. R. Collins, « Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer », *BioEssays*, vol. 21, nº 3, p. 238-246, 1999.

[26] B. Halliwell et O. I. Aruoma, « DNA damage by oxygen-derivated species - Its mechanism and measurment in mammalian systems », *FEBS Lett.*, vol. 281, nº 1-2, p. 9-19, 1991.

[27] G. M. Cooper, *The cell - A molecular approach, 2nd edition - Part II. The flow of genetic information - Chapter 5. Replication, maintenance, and rearrangements of genomic DNA - DNA repair*, 2nd éd. Sunderland (MA), 2000.

[28] J. Chandra, A. Samali, et S. Orrenius, « Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 29, nº 3-4, p. 323-333, 2000.

[29] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, et O. Kalayci, « Oxidative stress and antioxidant defense », *World Allergy Organ. J.*, vol. 5, nº 1, p. 9-19, 2012.

[30] A. K. Patlolla, J. Randolph, S. A. Kumari, et P. B. Tchounwou, « Toxicity evaluation of graphene oxide in kidneys of sprague-dawley rats », *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 13, nº 4, p. 1-15, 2016.

[31] T. A. Tabish, S. Chabi, M. Ali, Y. Xia, F. Jabeen, et S. Zhang, « Tracing the bioavailability of three-dimensional graphene foam in biological tissues », *Materials (Basel).*, vol. 10, nº 4, p. 1-13, 2017.

[32] U. M. Zanger et M. Schwab, « Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation », *Pharmacol. Ther.*, vol. 138, nº 1, p. 103-141, 2013.

[33] M. J. Zamek-Gliszczynski, K. A. Hoffmaster, K. Nezasa, M. N. Tallman, et K. L. R. Brouwer, « Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 27, nº 5, p. 447-486, 2006.

[34] S. P. C. Cole et R. G. Deeley, « Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP », *BioEssays*, vol. 20, nº 11, p. 931-940, 1998.

[35] W. S. Hummers et R. E. Offeman, « Preparation of Graphitic Oxide », vol. 80, nº 6, p. 1339, 1958.

[36] B. Lobato, C. Merino, V. Barranco, et T. A. Centeno, « Large-scale conversion of helical-ribbon carbon nanofibers to a variety of graphene-related materials », *RSC Adv.*, vol. 6, p. 57514-57520, 2016.

[37] L. Ayouni-Derouiche *et al.*, « Development of efficient digestion procedures for quantitative determination of cobalt and molybdenum catalyst residues in carbon nanotubes », *Carbon N. Y.*, vol. 80, nº 1, p. 59-67, 2014.

[38] L. Tabet *et al.*, « Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. », *J. Toxicol. Environ. Health. A*, vol. 72, p. 60-73, 2009.

[39] Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (Anses), « Avis relatif à « l'évaluation des risques liés au GRAPHISTRENGTH C100 réalisée dans le cadre du programme Genesis »; Saisine n° 2007-SA-0417 », 2011.

[40] S. Brunauer, P. H. Emmett, et E. Teller, « Adsorption of gases in multimolecular layers », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 60, nº 2, p. 309-319, 1938.

[41] F. Mouchet *et al.*, « Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis », *Aquat. Toxicol.*, vol. 87, p. 127-137, 2008.

[42] P. D. Nieuwkoop et J. Faber, « Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis », North-Holland, Amsterdam, 1956.

[43] ISO 21427-1, « Water Quality-Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei-Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae; International Organization for Standardization », Geneva, 2006.

[44] F. Mouchet, V. Teaniniuraitemoana, M. Baudrimont, G. Daffe, L. Gauthier, et P. Gonzalez, « Recovery capabilities of Xenopus laevis after exposure to Cadmium and Zinc », *Chemosphere*, vol. 139, p. 117-125, 2015.

[45] K. J. Livak et T. D. Schmittgen, « Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method », *Methods*, vol. 25, nº 4, p. 402-408, 2001.

[46] I. Barjhoux, P. Gonzalez, M. Baudrimont, et J. Cachot, « Molecular and phenotypic responses of Japanese medaka (Oryzias latipes) early life stages to environmental concentrations of cadmium in sediment », *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 23, p. 17969-17981, 2016.

[47] R. Weber, B. Blum, et P. R. Müller, « The switch from larval to adult globin gene expression in Xenopus laevis is mediated by erythroid cells from distinct compartments », *Development*, vol. 112, p. 1021-1029, 1991.

[48] L. Lagier *et al.*, « Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians », *Carbon N. Y.*, vol. 119, p. 72-81, 2017.

[49] J. Fandrey, « Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. », *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 286, nº 6, p. R977-R988, 2004.

[50] J. Aho, M. Helenius, S. Vattulainen-Collanus, T.-P. Alastalo, et J. Koskenvuo, « Extracellular ATP protects endothelial cells against DNA damage », *Purinergic Signal.*, vol. 12, nº 3, p. 575-581, 2016.

[51] K. Green, M. D. Brand, et M. P. Murphy, « Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes », *Diabetes*, vol. 53, nº Supplement 1, p. 110-118, 2004.

[52] V. C. Sanchez, A. Jachak, R. H. Hurt, et A. B. Kane, « Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review », *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 25, p. 15-34, 2012.

[53] Y. Liu *et al.*, « Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis », *Sci. Rep.*, vol. 3, nº 3469, p. 1-8, 2013.

[54] Y. Chang *et al.*, « In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells », *Toxicol. Lett.*, vol. 200, p. 201-210, 2011.

[55] P. P. Fu, Q. Xia, H. Hwang, P. C. Ray, et H. Yu, « Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species », *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, p. 64-75, 2014.

[56] A. B. Seabra, A. J. Paula, R. De Lima, O. Luiz Alves, et N. Duran, « Nanotoxicity of graphene and graphene oxide », *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 27, nº 2, p. 159-168, 2014.

[57] L. Ou *et al.*, « Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms », *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, nº 57, p. 1-24, 2016.

[58] A. M. Jastrzebska, P. Kurtycz, et A. R. Olszyna, « Recent advances in graphene family materials toxicity investigations », *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, nº 1320, p. 1-21, 2012.

[59] O. Radmark et B. Samuelsson, « 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation », *J. Lipid Res.*, vol. 50, nº Supplement, p. S40-S45, 2009.

[60] K. J. Sales, A. A. Katz, B. Howard, R. P. Soeters, R. P. Millar, et H. N. Jabbour,

« Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin E receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1 », *Cancer Res.*, vol. 62, p. 424-432, 2002.

[61] L. J. J. Crofford, « COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions », *J. Rheumatol. Suppl.*, vol. 49, nº 49, p. 15-19, 1997.

[62] C. Leuratti, N. J. Jones, E. Marafante, R. Kostiainen, K. Peltonen, et R. Waters, « DNA damage induced by the environmental carcinogen butadiene: identification of a diepoxybutane-adenine adduct and its detection by 32P-postlabelling », *Carcinogenesis*, vol. 15, nº 9, p. 1903-1910, 1994.

[63] W. Luczaj et E. Skrzydlewska, « DNA damage caused by lipid peroxidation products », *Cell. Mol. Biolology Lett.*, vol. 8, nº 2, p. 391-413, 2003.

[64] L. J. Marnett, « Oxyradicals and DNA damage », *Carcinogenesis*, vol. 21, nº 3, p. 361-370, 2000.

[65] E. J. Petersen et B. C. Nelson, « Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, p. 613-650, 2010.

[66] C. A. Che Abdullah *et al.*, « Primary liver cells cultured on carbon nanotube substrates for liver tissue engineering and drug discovery applications », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, nº 13, p. 10373-10380, 2014.

[67] Z. Ji *et al.*, « The hepatotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in mice », *Nanotechnology*, vol. 20, nº 44, p. 1-9, 2009.

[68] I. I. Vlasova *et al.*, « Enzymatic oxidative biodegradation of nanoparticles: mechanisms, significance and applications », *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 299, p. 58-69, 2016.

[69] T. Shimada et Y. Fujii-Kuriyama, « Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1 », *Cancer Sci.*, vol. 95, nº 1, p. 1-6, 2004.

[70] M. Polhuijs, G. Lankhaar, et G. J. Mulder, « Relationship between glutathione content in liver and glutathione conjugation rate in the rat in vivo. Effect of buthionine sulphoximine pretreatment on conjugation of the two 2-bromoisovalerylurea enantiomers during intravenous infusion », *Biochem. J.*, vol. 285, p. 401-404, 1992.

[71] S. Zhu, F. Luo, W. Chen, B. Zhu, et G. Wang, « Toxicity evaluation of graphene oxide on cysts and three larval stages of Artemia salina », *Sci. Total Environ.*, vol. 595, p. 101-109, 2017.

[72] A. L. Fernandes *et al.*, « Exposure to few-layer graphene through diet induces oxidative stress and histological changes in the marine shrimp Litopenaeus vannamei », *Toxicol. Res. (Camb).*, vol. 6, p. 205-214, 2017.

[73] A. E. Pegg, « Mammalian polyamine metabolism and function », *IUBMB Life*, vol. 61, nº 9, p. 880-894, 2009.

[74] P. Baumann et S. C. West, « Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 23, nº 7, p. 247-251, 1998.

[75] M. G. Marinus, « DNA mismatch repair », *EcoSal Plus.*, vol. 5, nº 1, 2014.

[76] M. Tammaro, S. Liao, N. Beeharry, et H. Yan, « DNA double-strand breaks with 5′ adducts are efficiently channeled to the DNA2-mediated resection pathway », *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, nº 1, p. 221-231, 2016.

[77] T. S. Dexheimer, « DNA Repair of Cancer Stem Cells », in *DNA repair of cancer stem cells*, L. A. Mathews, S. M. Cabarcas, et E. M. Hurt, Éd. Springer Netherlands, 2013, p. 19-32.

[78] A. J. Davis et D. J. Chen, « DNA double strand break repair via non-homologous end-joining », *Transl. Cancer Res.*, vol. 2, nº 3, p. 130-143, 2013.

[79] S. P. Jackson, « The recognition of DNA

damage », *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 6, nº 1, p. 19-25, 1996.

[80] P. A. Jeggo, « DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics », *Mutat. Res. - DNA Repair*, vol. 384, nº 1, p. 1-14, 1997.

[81] R. Saria *et al.*, « Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles », *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 107, p. 22-29, 2014.

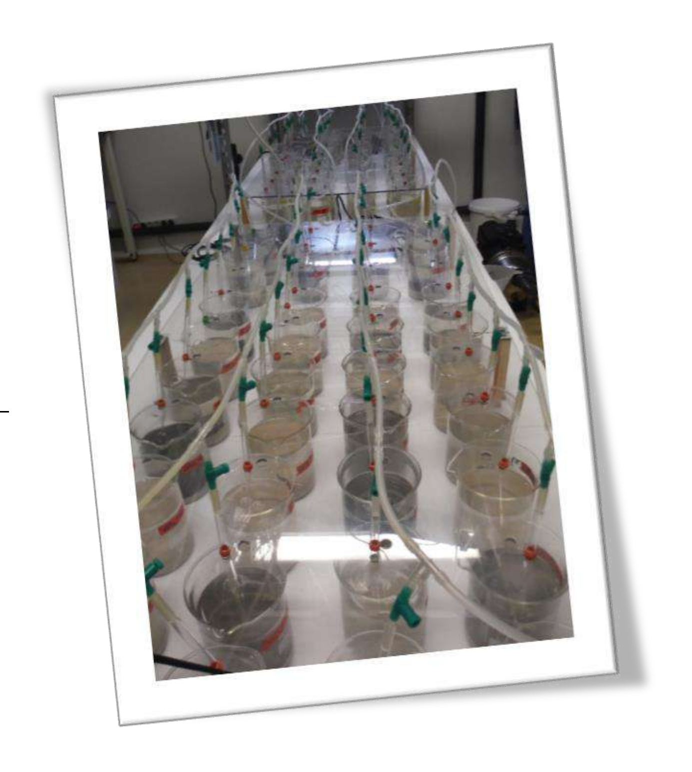
[82] L. Muzi *et al.*, « Examining the impact of multi-layer graphene using cellular and amphibian models », *2D Mater.*, vol. 3, nº 2, p. 1-10, 2016.

[83] P. Cejka *et al.*, « Methylation-induced G2/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1 », *EMBO J.*, vol. 22, nº 9, p. 2245-2254, 2003.

[84] Y.-B. Shi, « Cell-cell and cell-ECM interactions in epithelial apoptosis and cell renewal during frog intestinal development », *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 27, nº 3, p. 179-202, 1995.

[85] D. Baldessari *et al.*, « Global gene expression profiling and cluster analysis in Xenopus laevis », *Mech. Dev.*, vol. 122, p. 441-475, 2005.

CHAPITRE 6



ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DE L'OXYDE DE GRAPHÈNE CHEZ UN AUTRE ORGANISME DULÇAQUICOLE : *CHIRONOMUS RIPARIUS*

1. Evaluation des effets du GO chez *Chironomus riparius*

Résumé :

En dépit du développement toujours grandissant des nanoparticules, rares sont les données concernant leurs effets sur les macroinvertébrés dulçaquicoles. Au sein des nanoparticules de carbone, les effets de l'oxyde de graphène (GO) ont été étudiés chez le diptère *Chironomus riparius*. La mortalité, l'inhibition de croissance, le retard de développement et la tératogénicité (déformations du mentum) ont été évalués suite à l'exposition statique des larves pendant 7 jours en conditions normalisées. Les milieux d'exposition ayant été contaminés *via* la colonne d'eau, cette dernière et l'eau interstitielle du sédiment peuvent toutes deux être considérées comme des voies de contamination pour les larves.

Le taux de survie n'a pas été impacté en présence de GO, tandis que l'inhibition de croissance et les retards de développement ont montré une réponse dose-dépendante, significative à partir de 10 et 50 $mg.L^{-1}$, respectivement. Quant à la fréquence des déformations et à leur sévérité, elles se sont également montrées d'autant plus importantes que la concentration s'élevait, avec une différence significative par rapport au témoin dès 1 $mg.L^{-1}$. Certains types de déformations sont davantage représentés avec l'augmentation de concentration. Le parallèle entre l'augmentation des fréquences de déformation et le score de sévérité attribué montre que ce score résulte essentiellement d'une accumulation de plusieurs déformations (plusieurs types et plusieurs dents touchées) sur le même mentum, plutôt qu'une unique déformation très grave.

Ces résultats soulignent la pertinence de l'utilisation de *C. riparius* comme bioindicateur d'une pollution à l'oxyde de graphène, même si les larves ne montrent pas de sensibilité à faible dose –doses pourtant plus susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement.

In vivo toxicity of graphene oxide in larvae of the Diptera *Chironomus riparius*

L. LAGIER[1], F. MOUCHET[1]*, C. CHARY[1], L. EVARISTE[1], A. MOTTIER[1], S. CADARSI[1], C. SARRIEU[2,3], P. LONCHAMBON[2,3], E. PINELLI[1] , E. FLAHAUT[2,3] and L. GAUTHIER[1]

[1]EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

[2]Université de Toulouse, INP, UPS, Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), UMR CNRS 5085, F-31062 Toulouse cedex 9

[3]CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France

* Corresponding author.

Tel: +33534323936. E-mail: florence.mouchet@ensat.fr

Abstract

Despite the fast growing of nanoparticles, data concerning their effects on freshwater benthic macroinvertebrates are scarce. Among carbon-based nanoparticles, the effects of graphene oxide (GO) were studied in the midge *Chironomus riparius*. Mortality, growth inhibition, development delay and teratogenicity (mentum deformities) were investigated after a 7-day static exposure of the first instar larvae in normalized conditions. Since contamination was performed through the water column, both sediment and the overlying water act as contamination pathways that lead to the observed effects. Survival rate was not impacted by GO, whereas chronic toxicity followed a dose-dependent response. Significant growth inhibition and development delay were detected from 10 and 50 mg.L^{-1} of GO, respectively. Both the occurrence and the seriousness of the mouthpart deformities were found higher than the negative control from 1 mg.L^{-1} of GO. In particular, some types of deformities became more represented with the increased concentration, though the increased score of seriousness essentially results in an accumulation of several deformities (several types and several teeth impacted) on the same mentum. These results highlight the suitability of *C. riparius* as bioindicator of graphene oxide pollution, even if larvae were proved to be not sensitive to low doses.

Key words: chironomids, carbon-based nanoparticle, mortality, growth inhibition, development delay, teratogenicity

1. Introduction

Because of their unique properties, carbon-based nanoparticles get strong attention of scientific community for the last twenty years now. Among them, graphene, more recently synthetized (2004), opens the way towards new applications. Graphene is defined as a single-atom-thick sheet, composed by carbon atoms densely packed into a benzene-ring structure [1]. According to the definition proposed by Bianco *et al*. [2], materials made using graphene as a precursor could be gathered under the name of graphene family materials (GFMs). With carbon nanotubes (CNTs), these carbon allotropes are the strongest known materials with high flexibility, due to the high strength of the covalent bond C=C between two adjacent sp^2 carbon atoms [3]. Apart from their impressive mechanical properties, GFMs are also excellent electrical and thermal conductors, in addition to their specific magnetism. GFMs are expected to be more and more used in industries and in products intended for consumption [4], [5]. Among emerging applications, computing/data processing, data storage, communications, thermal management, displays, solar cells, sensing and imaging, capacitors, structural materials and numerous other technical fields may be quoted [6]. Among GFM, graphene oxide (GO) is particularly handled and attractive due to its relative stable dispersion in organic solvents or water, which facilitates the processing of graphene-based materials [7]–[9].

At each step of their life-cycle (production, use and recycling), GFMs such as GO are likely to be released into the environment. The fallouts of these materials need all the more to be assessed as, due to their extraordinary properties, they could also be more reactive with environment. Compared to the increasing number of studies dealing with synthesis and applications of nanoparticles, relatively few are devoted to the study of their toxicity, especially in the aquatic environment where GFM could be released. Some of these studies have reported both toxic and non-toxic effects. Acute toxicity, chronic toxicity, cytotoxicity, genotoxicity or developmental toxicity of GFMs are usually explained by their physico-chemical properties, such as the size, shape, surface area, concentration, agglomeration, surface functional groups, and oxygen content/surface charge [10]–[13]. Moreover, the presence of contaminants that could emerge during the processing of GFMs may also contribute to the observed toxicity [14]–[16]. Although the mechanisms of GFMs toxicity is still not completely understood, reactive oxygen species (ROS) which are generated is the most widely recognized mechanism of their effects towards living organisms [17], [18].

The study of aquatic toxicology uses to focus on pelagic organisms. However, contaminants that enter the aquatic ecosystem may rapidly become associated with sediments. In this context, the macroinvertebrate *Chironomus riparius* is a relevant and recognized test species [19], [20]. Chironomids are the most widely distributed group of insects in freshwater, while their larvae are often the dominant component of freshwater food-chains [21]. *C. riparius* has been widely used in acute and chronic testing due to its easy breeding in laboratory and its tolerance levels, generally ranging from high sensitivity of first instar larvae to high tolerance of the fourth instars [22], [23].

To our knowledge, the effect of GFMs on chironomids has not been reported yet. The aim of the present study is to assess the toxicity of GO in *C. riparius* larvae (at a macroscopic level) after a static exposure of 7 days in normalized conditions [24]. Several endpoints are considered: mortality, growth inhibition, development delay, and teratogenicity, which is considered as an excellent indicator of toxic stress in aquatic systems [25].

2. Materials and methods

2.1. Synthesis and characterization of graphene oxide (GO)

GO (nxGOH_37B) was provided by Antolin Group and prepared by oxidation of GANF© (Grupo Antolin Carbon Nanofibers) using the Hummer's method [26], [27]. GO characteristics are described by Lagier *et al*. (2017a, 2017b) [13], [28]. Briefly, data of elemental analysis (atomic percentage of C and

O atoms) were obtained by XPS analysis (69.3 and 30.7 at.%, respectively). Specific surface area was 206 $m^2.g^{-1}$, according to the Brunauer, Emett and Teller's method (BET) (N_2 adsorption) on powdered sample of GO. Number of layers of GO was estimated to be from 1 to 5 at HRTEM [29], [30]. Lateral dimensions from 0.2 to 8 µm were assessed by TEM. The morphology of GO at TEM is presented by Lagier *et al*. (2017) [28].

2.2. GO physical dispersion before contamination

The desired quantity of GO powder was first weighed and dispersed for 30 minutes in an ultrasonic bath (Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 kHz) in deionized water to obtain a stock suspension (5 $mg.mL^{-1}$). Then, depending on the desired concentration, required amounts of this suspension were introduced in individual glass test tubes and adjusted to 20 mL by addition of deionized water. For each concentration, 7 test tubes of 20 mL were thus prepared, corresponding to the number of exposure replicates.

2.3. *Chironomus* rearing

Chironomus breeding was maintained in laboratory according to the norms AFNOR (2004) [24] and Environment Canada (1997) [31] in a thermostated room at 21±1°C, following a 16-8h light-dark cycle in 20 L aquaria constructed with an upper Plexiglas® mating chamber. The culture water was reconstituted (RW) with deionized water and salts (66,2 $mg.L^{-1}$ $CaCl_2,2H_2O$; 61,4 $mg.L^{-1}$ $MgSO_4,7H_2O$; 96 $mg.L^{-1}$ $NaHCO_3$; 4 $mg.L^{-1}$ KCl; 63 $mg.L^{-1}$ $CaSO_4,2H_2O$; 1 $mg.L^{-1}$ NaBr), aerated, and maintained at a depth of around 20 cm. Sand of fine grain size (< 350 µm) from Fontainebleau (VWR, France) was used as substrate (depth of approximately 3 cm). *Chironomus* were fed daily with 400 mg per tank of finely crushed, dispersed in distilled water (15 minutes at ultrasonic bath; Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 kHz) fish food (Tetramin®).

Few days before the exposure, egg masses are collected from the aquaria and individually put in small plastic vessel containing RW until they hatch. Egg masses which hatch the same day are placed in crystallizing dish containing 1L of RW, a fine layer of sand, and 150 mg of Tetramin®. Young 48-hour old larvae are then collected by pipetting to be used in the experiment.

2.4. Experimental design and exposure conditions

Chironomus riparius larvae were exposed to GO in static conditions during 7 days, following a 16-8h light-dark photoperiod, according to the normalized procedure [24], [31]. Prior to exposure, 7 glass beakers (Pyrex®) per condition were prepared, corresponding to 7 replicates. Each beaker was filled with 75 mL of sand and 265 mL of RW. Gentle aeration of water was ensured by glass Pasteur pipets linked to a pump *via* pipes. The first day of exposure, ten 48-hour old *Chironomus* larvae were introduced in each beaker by pipetting. Aeration was interrupted during *Chironomus* introduction in order to allow them to sink more easily. Then, contamination was performed, consisting in introducing GO in the water column. 20 mL suspensions of GO as described above were dispersed again for 2 minutes in an ultrasonic bath before being poured in beakers. The test tubes were rinsed twice with 20 mL of RW to collect remaining GO on the tubes walls, leading to experimental units of 300 mL of supernatant water and 25 mL of interstitial water. A negative control (NC) composed of sediment and RW alone was also achieved in 7 replicates (the 20 mL of GO suspension were replaced by distilled water). Each beaker received daily 1 mg of Tetramin®. Aeration was restarted the day following *Chironomus* introduction until the end of the experiment. Water quality parameters, such as pH (7-8), temperature (21 ± 1°C), nitrite, ammonia and dissolved oxygen content (9.4 ± 0.3 $mg.L^{-1}$) were tracked throughout the experiment and did not vary between the tested conditions. Nitrite and ammonia concentrations were always found below 5 and 10 $mg.L^{-1}$, the maximum thresholds the normalized test can approve, respectively [24], and which are not harmful to larvae and their development [32].

2.5. Acquisition of data

2.5.1. Mortality determination

At the end of exposure, mortality was recorded by counting the number of chironomids alive. Survival rates were calculated from the number of survivors compared to the number of chironomids introduced initially. As normality test failed, statistical comparison of each condition to the NC was carried out thanks to Kruskal-Wallis' test on SigmaPlot 12.0 software.

2.5.2. Growth measurement

At the end of exposure, surviving larvae were stored in ethanol (70 %) until their measurement. Larvae were aligned alongside a graph paper under binocular (Olympus SZX7) equipped with a photo camera (Olympus E-620). Larvae were then measured on ImageJ® software in order to determine their growth inhibition. Body length of each contaminated group was compared to the NC using Kruskal-Wallis' test as normality test failed. Dunn's post-hoc test was then applied in order to isolate the group or groups that differ from the others. Statistical analysis was carried out on SigmaPlot 12.0 software.

2.5.3. Development delay measurement

Under binocular microscope, *Chironomus* larvae were beheaded and cephalic capsules were placed onto their ventral side. After being photographed like whole chironomids and measured on ImageJ® software, cephalic capsules of larvae were used to determine the development stage of each *Chironomus*. According to Environment Canada [31], larvae with cephalic capsule ranged from 0.07 to 0.12 mm in width correspond to stage 1; from 0.13 to 0.24 mm to stage 2; from 0.26 to 0.40 mm to stage 3, and from 0.43 to 0.60 mm, to stage 4. Larvae which do not reach development stage 4 at the end of the experiment were considered as development delayed. In each treatment group, the proportion of stage-4-larvae and non-stage-4-larvae was determined and compared to the NC. Statistical comparisons of these proportions were performed via Chi-square test with Yates correction on SigmaPlot 12.0 software.

2.5.4.Teratogenicity assessment

Although not a part of normalized procedure, teratogenicity was included in the assessments to evaluate the potential of GO to induce deformities of chironomids menta after 7 days of exposure. Such deformities could appear during every molt of the larvae (at each development stage). Consequently, observing deformities is more probable at the last stage of development of larvae. Thus, only cephalic capsule at stage 4 were taken into account for teratogenicity assessment. Therefore, after beheading, cephalic capsules were first stored in ethanol (70 %), then discolored with potassium hydroxide (15%) at 95°C during 12 minutes, and finally replaced in ethanol (70 %) for 12 hours to stop the reaction. After that, capsules were mounted on a microscope slide and fixed with Quick-hardening mounting medium (Sigma). Microscopic observation of cephalic capsules allows then to evaluate the deformities of the mentum according to the works of Warwick and Tisdale (1988) [25], which describe the types of anomalies that could be encountered in *Chironomus*, and Vermeulen *et al.* (1998) [33], which assign a score to each anomaly depending on its severity. On the base of these works, the present paper deals with the frequency of apparition of total deformities in evaluated larvae. To a lesser extent, the frequency of apparition of each type of deformities was also investigated, as well as the frequency of single and multiple deformities (only one tooth impacted, or several teeth impacted, respectively). The corresponding proportions (for example, number of deformed *vs* non-deformed menta) of each exposed group were compared to the NC thanks to Chi-square test with Yates correction, or Odds ratio test when requirements for Chi-square were not fulfilled. Moreover, mean severity score of each treatment was also calculated and statistically compared to the NC thanks to one way Anova on ranks followed by Dunn's post-hoc test. Statistical analysis was carried out on SigmaPlot 12.0 software.

3. Results

3.1. Mortality

In compliance with conditions required by the norm [24], the survival rate of chironomids in the negative control was found higher than 70% (with a confidence interval lower than 30%), suggesting that conditions were sufficient to ensure survival of larvae. As shown in Figure 1, no significant mortality was recorded whatever the tested concentration of GO, compared to the NC.

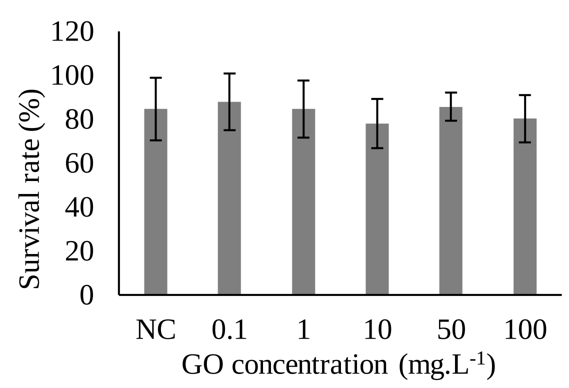


Figure 1. Survival rate of *Chironomus riparius* larvae after 7 days of static exposure to GO (in percentage of the initial number of introduced organisms). NC: negative control.

3.2. Growth

At the end of the 7-day experiment, the mean length of whole body of *Chironomus* larvae were higher than 9 mm in the negative control, in accordance with normalized requirements [24]. Graphene oxide induced a dose-dependent growth inhibition in larvae, which was significant from 10 mg.L^{-1} (Figure 2).

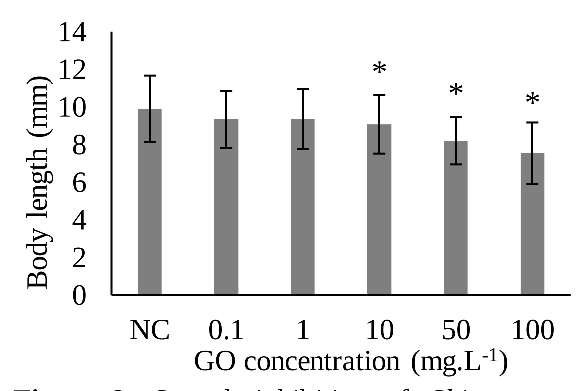


Figure 2. Growth inhibition of *Chironomus* larvae after 7 days of static exposure to GO. NC: negative control; "*" ($p \leq 0.05$) indicates significant difference of body length compared to the NC.

3.3. Development delay

On the base of their width, cephalic capsules of larvae were each assigned to a specific stage of development. Only development stages 3 and 4 were observed after 7 days, and larvae which did not reach stage 4 were considered as delayed. Development delay frequencies exhibit dose-dependent response. Especially, a strong and significant development delay was observed from 50 mg.L^{-1} of GO (Figure 3).

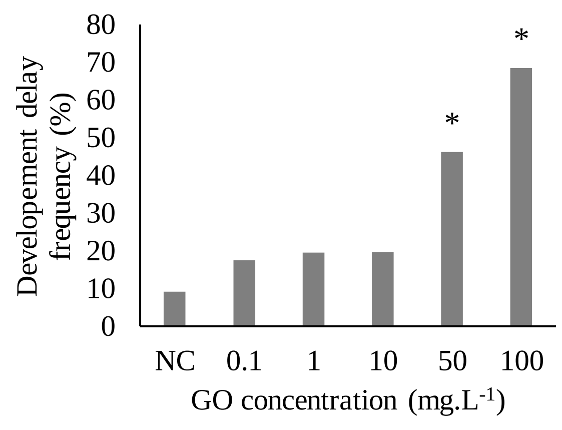


Figure 3. Development delay frequencies of *Chironomus* larvae after 7 days of static exposure to GO. NC: negative control; "*" ($p \leq 0.05$) indicates significant difference of development delay frequency compared to the NC.

3.4. Macroscopic observations

Observation of chironomids under binocular magnifier after 7 days of exposure to GO reveals the presence of agglomerates of this nanoparticle in the digestive tract of exposed larvae, compared to the NC. These agglomerates are visible though the transparent tegument and are all the more obvious as the concentration increases (Figure 4). Observations of cephalic capsules clearly highlight two distinct categories of size including larger capsules (larvae at stage 4) and smaller capsules (larvae at stage 3). Moreover, Figure 4 illustrates the media of exposure at the end of the experiment, which show that GO sedimentation and bioturbation occurred. Actually, GO sedimentation essentially took place over the 24 first hours of the experiment, and air bubbles were not sufficient to re-suspend GO in the water column thereafter. Some *Chironomus* sheaths composed of

sediment and GO agglomerates have also been observed throughout the experiment. However, sediment appears quite weakly reshaped, since GO agglomerates were buried only under few millimeters of sand according to our visual observations. Apart from eventual non-agglomerated fraction of nanoparticles, not visible to the naked eye, *Chironomus* exposure to GO would essentially concerned the water-sediment interface.

3.5. Teratogenicity

The study of presence/absence of deformity(ies) in *Chironomus* larvae reveals an increased frequency of larvae with deformed mentum with increasing GO concentration (Table 1). From 1 mg.L^{-1}, the frequency of deformed larvae is significantly higher than for the NC. Additionally, for a given deformed mentum, a variable number of teeth may be impacted. Detailed results of number of menta with 1 to 8 deformed teeth show that the proportion of single deformities decreases with increasing concentration, while the proportion of multiple deformities increases (Table 1).

Apart from deformities frequencies, the types of deformities were also investigated. Figure 5 gives some examples of deformities of the mentum of *Chironomus riparius* larvae, according to the morphologic descriptions made by Warwick and Tisdale (1988) [25]. In particular, Figure 5.B shows asymmetry of lateral teeth, one of the most common deformities observed in NC and larvae exposed to low concentration of GO, while Figure 5.F represents a set of deformities which, when they are present together in a same mentum, greatly increase the score of teratogenicity, as observed when GO concentration increases.

In negative control larvae, it can be observed that the main types of deformities are asymmetry and reduction. Such deformities are slight but abundant in the negative control since they alone represent 90% of all deformities (Table 2). Globally, this proportion tends to decrease with increasing concentration, whereas the frequencies devoted to tooth enlargement and splitting increase significantly. Some deformities types remain very poorly expressed whatever the tested concentration, especially addition, deletion and gap, and to a lesser extent, displacement and distortion.

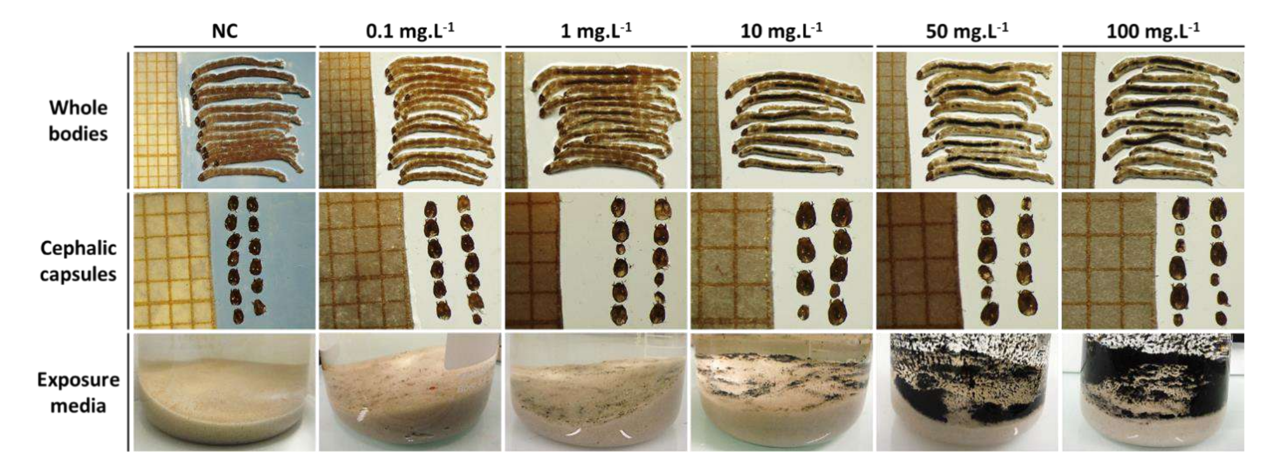


Figure 4. Macroscopic observations of whole bodies and cephalic capsules of *Chironomus riparius* under binocular magnifier and their corresponding media of exposure at the end of the experiment from 0.1 to 100 mg.L^{-1} of GO, compared to the negative control (NC).

Table 1. Frequencies (%) of *Chironomus riparius* larvae with deformed mentum compared to the total number of evaluated larvae for the negative control (NC) and each concentration of exposure to GO (0.1 to 100 mg.L^{-1}). Detailed frequencies (%) of single and multiple deformities are specified for each condition. %: percentage of larvae with deformed mentum compared to the total number of larvae; n: number. Significant differences ($p \leq 0.05$) of proportions between deformed and non-deformed larvae (or between menta with 1 deformed tooth and menta with non-1 deformed tooth, and so on), compared to the NC, are emphasized in bold characters.

	NC		**0.1 mg.L^{-1}**		**1 mg.L^{-1}**		**10 mg.L^{-1}**		**50 mg.L^{-1}**		**100 mg.L^{-1}**	
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
Number of larvae with deformed mentum	43	66	44	69	**51**	85	**55**	100	**36**	100	**20**	100
Number of menta with												
1 deformed tooth	19	29	16	25	**10**	17	**6**	11	**1**	3	**0**	0
2 deformed teeth	23	35	21	33	22	36	**16**	29	**1**	3	**1**	5
3 deformed teeth	1	2	6	9	**11**	18	**16**	29	**12**	33	**4**	20
4 deformed teeth	0	0	0	0	2	3	**6**	11	**12**	33	**4**	20
5 deformed teeth	0	0	1	2	4	7	**8**	14	**8**	22	**7**	35
6 deformed teeth	0	0	0	0	1	2	2	4	1	3	2	10
7 deformed teeth	0	0	0	0	1	2	1	2	1	3	0	0
8 deformed teeth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10
Number of evaluated larvae	65		64		60		55		36		20	

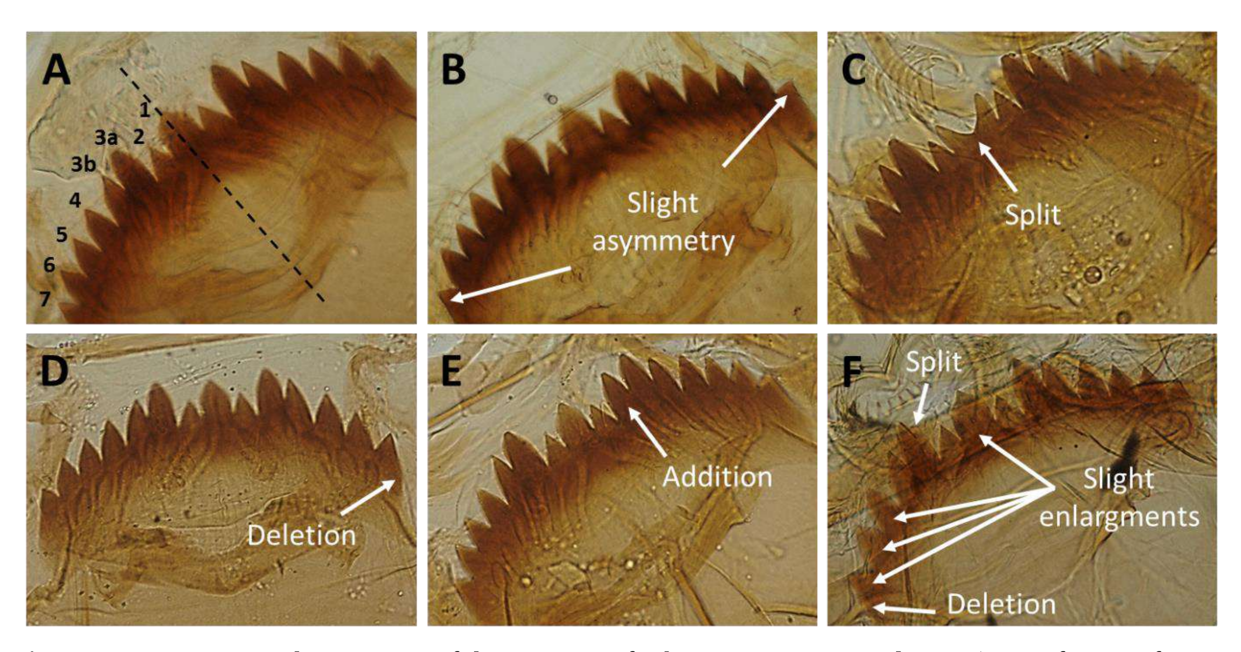


Figure 5. Microscopic observations of the mentum of *Chironomus riparius* larvae (magnification factor x 400). A: non-deformed mentum; teeth are numbered from 1 to 7 following a symmetry axis indicated by dash black line. B: example of lateral teeth slight asymmetry. C: split of central tooth, extending over more than the half of the tooth's length. D: tooth deletion (n°7). E: tooth addition (between n°3b and 4). F: several types of deformities on the same mentum, including tooth deletion (n°7), split (n°3a) and slight teeth enlargements (n°1, 4, 5, 6).

Table 2. Frequencies (%) of each type of deformities of *Chironomus* mentum within each condition of exposure to GO.

	NC	0.1 mg.L^{-1}	1 mg.L^{-1}	10 mg.L^{-1}	50 mg.L^{-1}	100 mg.L^{-1}
Asymmetry	52,9	57,4	32,8	28,5	31,1	23,9
Reduction	37,1	29,8	41,6	36	21	20,2
Addition	1,4	0	0	0,5	0,6	1,8
Displacement	2,9	0	0	6,5	3	1,8
Enlargement	2,9	8,5	16,8	11,8	21,5	22
Deletion	0	2,1	3,7	1,1	0	0,9
Split	1,4	1,1	4,4	14,5	18	24,8
Distortion	1,4	0	0,7	1,1	4,8	4,6
Gap	0	1,1	0	0	0	0

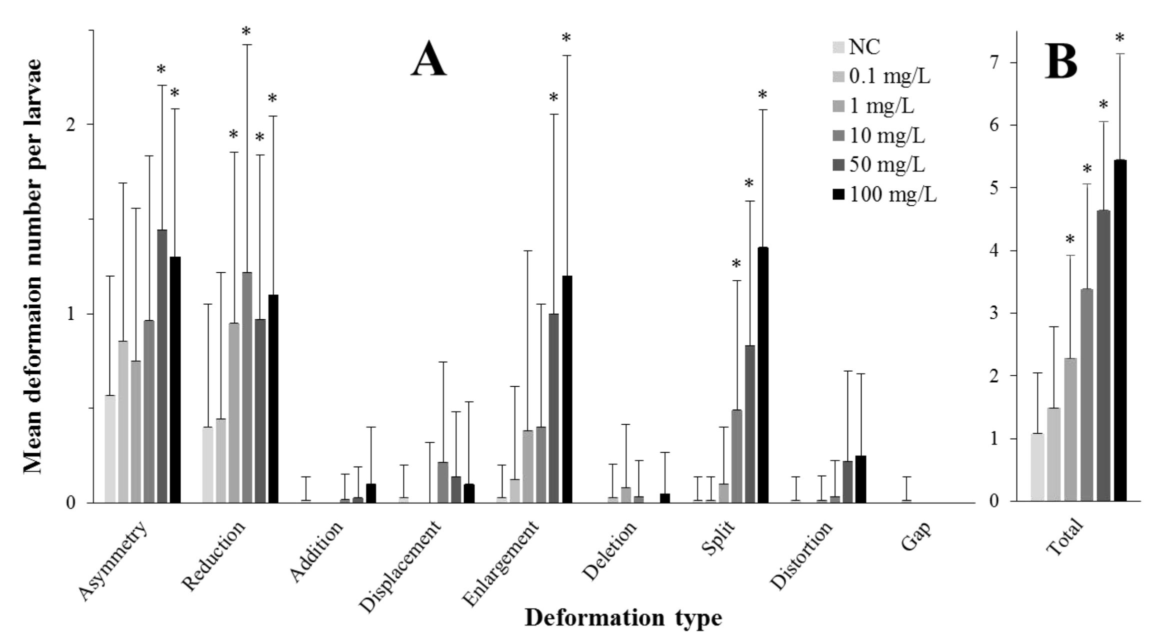


Figure 6. Mean number of deformity(ies) per mentum of *Chironomus* larvae, depending on each type of deformity (Figure 6.A) or all types (Figure 6.B). "*" indicates significant differences ($p \leq 0.05$) compared to the negative control (NC).

To complete the results of deformities frequencies (total and per type; Tables 1 and 2, respectively), mean number of deformity(ies) per larvae was calculated for total and each type of deformity. Figure 6.B highlights that the mean number of total deformities (all types) per larvae increases with increasing concentration, which is statistically significant from 1 mg.L^{-1} compared to the NC, and which echoes Table 1. On the other hand, Figure 6.A reports the mean number of each type of deformity per larvae, depending on GO concentration. In compliance with the type of deformities frequencies (Table 2), the mean number of addition, deletion, gap, displacement and distortion per larvae remains low whatever the tested concentration. However, concerning asymmetry, reduction, enlargement and split, it globally appears that a given larva shows more deformities with increasing GO concentration, even if frequencies of asymmetries and reductions decrease with increasing concentration compared to other types of deformities (Table 2).

Finally, teratogenicity seriousness was assessed by using the scores that Vermeulen *et al*. (1998) [33] assign to each deformity, as a function of their type and of their magnitude. On the base of these information, mean scores per larva were calculated and compared to the NC, showing a regular increase of seriousness with increasing concentration (Figure 7).

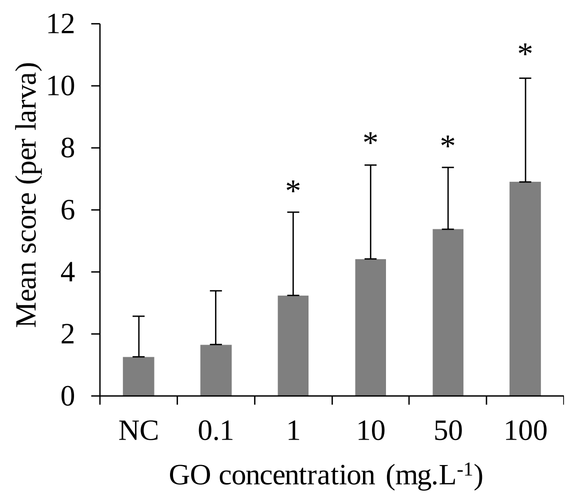


Figure 7. Mean seriousness of mentum deformities per *Chironomus* larvae. "*" indicates significant differences ($p \leq 0.05$) compared to the negative control (NC).

4. Discussion

The aim of the present paper was to assess the potential toxicity of a large concentration range of graphene oxide (0.1 to 100 mg.L^{-1}) towards *Chironomus riparius* larvae in normalized conditions [24]. Our approach consisted in contaminating the water column in order to simulate conditions of emergent contamination. Visual observation of the media of exposure shows that, from the beginning of 7-day exposure, most of GO settles down and forms macroscopic agglomerates, which are not redispersed by bubbling (Figure 4). Thus, because of their respiration and filter-feeding behavior [21], [34], *Chironomus* larvae were exposed to GO present at the bottom of the water column, at the water-sediment interface. Given the eventual spread of GO due to water exchanges, and above all the burrowing activity of larvae [34], a portion of GO agglomerates could also be found in the sediment (Figure 4). In addition, *Chironomus riparius* larvae could live in tubes they built with the sediment particles [35], and so potentially with GO nanoparticles. Consequently, the measured effects of GO on larvae take into account both water column and sediment contamination pathways.

4.1. Mortality

After 7 days of exposure to GO in static conditions, survival results do not show any effect of the nanoparticle compared to the control group, even at the higher concentrations (Figure 1). This finding highlights that GO is not lethal for larvae, even from their early stage of development (stage 1, 48-hour-old). Similarly, Waissi-Leinonen *et al*. (2015) [36] report no acute toxicity in *C. riparius* larvae exposed to fullerene contaminated sediment (from 0.0004 to 80 mg.kg^{-1}) after 10 days of exposure. In contrast, double-walled carbon nanotubes (in presence of natural organic matter) have induced a significant mortality in larvae from 1 mg.L^{-1} (unpublished results).

4.2. Growth inhibition

GO clearly induces a monotonic dose-dependent growth inhibition, which is significant from 10 mg.L^{-1} (Figure 2). Other studies report that chironomid larvae growth may be affected by carbon-based nanoparticles such as fullerene or carbon nanotubes [36], [37]. In the present study, macroscopic observations demonstrate that larvae unselective feeding behavior [34] lead them to ingest GO, as evidenced in their digestive tract (Figure 4). GO appears all the more concentrated in digestive tract than it is concentrated in the medium of exposure, suggesting that it would be responsible for growth inhibition because of interaction with nutrients. Similarly, growth inhibition was observed in amphibians after daily ingestion of GO [38]. The surface of GO includes both hydrophilic (polar hydroxyl, epoxide, carboxyl groups) and unmodified hydrophobic graphenic domains [39] which can make it interacting with various compounds on which it can complex with. For example, the negatives charges of oxygen-containing groups of nanocarbon's surface show relatively high sorption capabilities for metal ions [40], [41], especially for bivalent cations [42]. On the

contrary, hydrophobic domains could adsorb solutes with a molecular structure presenting hydrophobicity, planarity/sp^2 hybridization for π-π interactions, and positive charge [43]. Thus, GO could cause growth inhibition because of eventual sequestration of essential micronutrients such as amino-acids, vitamins, nucleic acids and other macromolecules [18].

Moreover, the toxic action of GO may be mediated by cell membrane injury, oxidative stress [10], [18], or mechanical action of GO agglomerates on larvae organs. The presence of the nanoparticle at the water-sediment interface (Figure 4), in the *Chiromonus* sheaths, and sometimes on the skin of the larvae raises the question of their respiratory disturbance. Indeed, the respiration of the larvae is accomplished by simple diffusion of gases through the skin, in particular through the anal and ventral papillae that project from the body surface and that are often exceedingly thin [44]. This eventual respiratory disturbance might force larvae to move towards more oxygenated areas, that could represent an energetic cost and that could lead to a negative impact on growth. In the same vein, Gusev *et al*. (2012) [45] found that carbon nanotubes may induce an increase activity of the salivary glands of *Chironomus*, associated with a short-term cell hyper-compensation to mitigate the stressing action of the contaminant and restore homeostasis in somatic cells. Such subcellular response might also represent a decrease of energy available for growth.

4.3. Development delay

Along with growth inhibition, a dose-dependent development delay is observed in larvae exposed to GO (Figure 3). From 50 $mg.L^{-1}$, the proportion of stage-4 larvae is significantly lower than the negative control. As well as growth inhibition, this delay may be due to an eventual increased energy cost of GO tolerance which would slow down the normal development process. Development delay could in turn delay the emergence of adult *Chironomus*, which may have significant consequences at the population level. For instance, low adult numbers may impact the success of forming a couple and possibly lead to a reduction in genetic fitness of the population [19], [46]. However, deleterious effects on growth and development are not significant at the lowest tested concentrations of GO. This is quite reassuring knowing that these low concentrations are near to (or higher than) those which are supposed to exist in the environment.

4.4. Teratogenicity

Teratogenicity refers to the deformities which may be found in different structures of the cephalic capsule of chironomids [25]. Such deformities are probably induced through the interference of a phenomenon during the molting [33], and they have to be distinguished from the normal wear or breakage of mouthparts, which occur due to feeding activities in coarse sediments [47]. Antennae and several mouthparts may be concerned by deformities, including, pecten, mandibles and mentum, and each of them may provide a specific response profile to a contaminant [48]–[50]. Only mentum was investigated in the present paper because it positions easily onto microscopic preparation and it is so convenient for routine analysis, while providing a high sensitivity to contaminants [25], [33].

Frequency of deformities was determined as the ratio between the number of deformed menta and the total number of observed menta, expressed in percent. Positive correlations between chironomid deformities and the degree of contamination have been established, through these relationships were only considered as qualitative [47]. On the base of paleo-limnologic records, natural mentum deformities levels have been estimated to vary between 0 and 0.8 % [51]. However, possibly due to the ubiquitous dispersion of manufactured chemicals, levels in “clean” sites currently vary between 0 and 8 % [52]. In spite of that, the results of our negative control are not in the same range (66 %), which could explain why a maximum plateau of deformities frequency is reached from 10 $mg.L^{-1}$ (Table 1). This indicates a possible bias due to subjectivity of the enumeration of deformities. Indeed, slight deformities (slight asymmetries and/or reductions; Figure 5) concerning the lateral

teeth account for more than 70 % of the deformed menta in the negative control (Table 2). If these slight deformities were not taken into account, our results would be between 0 and 8 %. Nevertheless, these slight deformities were not observable in all larvae; for that reason we think that they would be important to take into account. In larvae exposed to GO, the frequency of larvae with a deformed mentum shows a dose-response relation, with a significant increase from 1 $mg.L^{-1}$ compared to the negative control. Moreover, for each deformed mentum, the number of deformed tooth (teeth) increases with the concentration (Table 1). This finding could be explained in part by physical damages induced by GO, or by oxygen functions on its surface that could notably induce oxidative stress [12], [13], [53], [54]. Morphological deformities result in physiological disturbance during molting [55]. Since molting is regulated by hormones [56], GO may negatively impact hormonal processes. It could also be hypothesized that GO impact the expression of genes such as those encoding for HSP 40 and 90, which might be involved in the occurrence of deformities in *C. riparius* [57]. Moreover, the significant growth inhibition and development delay concomitantly observed with increased teratogenicity may point out a general stress in larvae that could result from a lack of reserves of energy. As previously mentioned, GO is able to sequestrate essential nutrients and limit their absorption [38].

In addition, Table 2 shows the relative proportions of the types of deformities for a given condition of exposure. For instance, 52.9 % of all the deformities of the NC are asymmetries, whereas asymmetries represent 23.9 % of all the deformities in larvae exposed to 100 $mg.L^{-1}$ of GO. These observations are complementary to Figure 6, which shows that the mean number of asymmetries per larvae significantly increases with the concentration of GO. The teeth reductions follow the same pattern. Besides asymmetry and reduction, several types of tooth deformities exist. Figure 5 gives some examples of them. Some are very few displayed whatever the conditions of exposure (tooth addition, deletion, displacement, distortion and gap). In contrast, tooth splitting represents 1.4 % of all the deformities in the NC, whereas it counts for 24.8 % in larvae exposed to 100 $mg.L^{-1}$ of GO. Thus, tooth splitting is all the more observable than the concentration increases, as well as enlargement (Table 2, Figure 6).

Although the type of deformities would not be specifically assigned to a contaminant, they are rather general indicators of toxic stress [33], [58], [59]. Our results would suggest that depending on the concentration of GO, the toxic stress increases and changes, as attested by the strong intensification of split and enlargement. That would highlight complex mechanisms inducing teratogenicity. In chironomid larvae, other studies report the induction of mouthpart deformities by various contaminant, including organic compound [56], heavy metals [59], [60] or uranium [35]. However, the assessment of teratogenicity of nanoparticles in this organism is extremely limited. In chironomids exposed in microcosm to spherical, non-coated cerium dioxide, a significant increase in the frequency of tooth (teeth) deletion was observed, whereas the frequency of deformities as a whole was not changed [61]. To our knowledge, the present paper is the first to observe teratogenic effects in chironomids after an exposure to a carbon-based nanoparticle. Unpublished data dealing with double-walled carbon nanotubes dispersed with natural organic matter did not show any significant teratogenicity in the exposed organisms, possibly due to the mortality of larvae with the lowest fitness, which are the most likely to present deformities. Nevertheless, the sensitivity of each tested batch of chironomids as well as their genetics and their generation should be taken into account when assessing and comparing morphological deformities [62], [63].

Globally, the mean number of deformities per larvae (for all types; Figure 6.B) increases significantly with the concentration of GO. Simultaneously, the scores (seriousness) of deformities illustrated by the Figure 7 are all the more high than the concentration increases, with a mean score per larvae significantly higher than the negative control from 1 $mg.L^{-1}$ of GO. In comparison to the global frequencies

of deformities per larvae, the increase of these scores results in an accumulation of several deformities on the same mentum, rather than a global and very serious deformities.

5. Conclusion

Chironomus riparius larvae exposed to GO for seven days show no mortality but a clear dose-dependent chronic toxicity, through growth inhibition, development delay and teratogenicity. Variations in the frequency, the types, and the seriousness of deformities were observed to be significantly GO concentration dependent. Useful information may be contained in all of these biomarkers, attesting the relevance of chironomids as bioindicators of the impact of graphene oxide under our experimental conditions. However, larvae did not expressed any toxic effect at the lowest tested concentration (0.1 $mg.L^{-1}$), whereas this concentration were previously found genotoxic in amphibian [13]. That suggests the insensitivity of larvae at doses thought possible to be encountered in environment.

Further investigation is still needed to establish the mechanisms of GO toxicity in chironomids, in particular concerning the morphological deformities. Moreover, our experimental conditions was based on the contamination of the water column. In spite of the bioturbation activity of larvae and the sedimentation of GO, that would be interesting to compare our results with an exposure based on spiked sediment and “clean” water column in order to determine how the fate of GO influence its bioavailability and its toxicity. Finally, because of the abundance of chironomids in many aquatic ecosystems, they are often an important component of food webs. Thus, studying the impact of GO on chironomids in a reconstituted trophic chain is currently in progress in our laboratory.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was supported by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research. The research has also received funding from the European Union Seventh Framework Programme under grant agreement n°604391 Graphene flagship.

We are grateful for the initial strain of *Chironomus riparius* that was provided by the Ecole Nationale des Travaux Publics de l’Etat (ENTPE, Vaulx-en-Velin, France).

References

[1] K. S. Novoselov *et al.*, « Electric field effect in atomically thin carbon films », *Science (80-.).*, vol. 306, p. 666-669, 2004.

[2] A. Bianco *et al.*, « All in the graphene family - A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials », *Carbon N. Y.*, vol. 65, p. 1-6, 2013.

[3] V. Georgakilas, J. A. Perman, J. Tucek, et R. Zboril, « Broad family of carbon nanoallotropes: classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures », *Chem. Rev.*, vol. 115, nº 11, p. 4744-4822, 2015.

[4] A. K. Geim et K. S. Novoselov, « The rise of graphene », *Nat. Mater.*, vol. 6, p. 183-191, 2007.

[5] A. K. Geim, « Graphene: status and prospects », *Science (80-.).*, vol. 324, p. 1530-1534, 2009.

[6] A. McWilliams, « Graphene: technologies, applications and markets », *February 2016*, 2016. [En ligne]. Disponible sur: https://www.bccresearch.com/market-research/advanced-materials/graphene-technologies-applications-markets-report-avm075d.html. [Consulté le: 01-mai-2017].

[7] S. Stankovich *et al.*, « Synthesis of graphene-based nanosheets via

chemical reduction of exfoliated graphite oxide », *Carbon N. Y.*, vol. 45, p. 1558-1565, 2007.

[8] S. Park *et al.*, « Aqueous suspension and characterization of chemically modified graphene sheets », *Chem. Mater.*, vol. 20, nº 21, p. 6592-6594, 2008.

[9] J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martinez-Alonso, et J. M. D. Tascon, « Graphene oxide dispersions in organic solvents graphene oxide dispersions in organic solvents », *Langmuir*, vol. 24, nº 19, p. 10560-10564, 2008.

[10] L. Ou *et al.*, « Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms », *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, nº 57, p. 1-24, 2016.

[11] M. Ema, M. Gamo, et K. Honda, « A review of toxicity studies on graphene-based nanomaterials in laboratory animals », *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 85, p. 7-24, 2017.

[12] A. Bianco, « Graphene: safe or toxic? The two faces of the medal », *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 52. p. 4986-4997, 2013.

[13] L. Lagier *et al.*, « Removal of genotoxicity of graphene oxide in vivo: towards an environmentally safe-by-design approach », 2017.

[14] E. J. Petersen *et al.*, « Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, p. 4226-4246, 2014.

[15] L. Ayouni-Derouiche *et al.*, « Development of efficient digestion procedures for quantitative determination of cobalt and molybdenum catalyst residues in carbon nanotubes », *Carbon N. Y.*, vol. 80, nº 1, p. 59-67, 2014.

[16] S. P. Mukherjee *et al.*, « Detection of endotoxin contamination of graphene based materials using the TNF-a expression test and guidelines for endotoxin-free graphene oxide production », *PLoS One*, vol. 11, nº 11, p. 1-17, 2016.

[17] X. Guo et N. Mei, « Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials », *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, nº 1, p. 105-115, 2014.

[18] V. C. Sanchez, A. Jachak, R. H. Hurt, et A. B. Kane, « Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review », *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 25, p. 15-34, 2012.

[19] M. M. Watts et D. Pascoe, « Use of the freshwater macroinvertebrate Chironomus riparius (diptera: chironomidae) in the assessment of sediment toxicity », *Water Sci. Technol.*, vol. 34, nº 7-8, p. 101-107, 1996.

[20] E. J. Taylor, S. J. Blockwell, S. J. Maund, et D. Pascoe, « Effects of lindane on the life-cycle of a freshwater macroinvertebrate Chironomus riparius Meigen (insecta: diptera) », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 24, nº 2, p. 145-150, 1993.

[21] P. Armitage, P. S. Cranston, et L. C. V. Pinder, « The chironomidae. The Biology and ecology of non-biting midges », *J. Anim. Ecol.*, vol. 64, nº 5, p. 667-673, 1995.

[22] C. P. McCahon et D. Pascoe, « Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests », *Chemosphere*, vol. 17, nº 12, p. 2471-2480, 1988.

[23] K. A. Williams, D. W. J. Green, D. Paseoe, et D. E. Gower, « The acute toxicity of cadmium to different larval stages of Chironomus riparius (diptera: chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation », *Oecologia*, vol. 70, nº 3, p. 362-366, 1986.

[24] AFNOR, « XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius », 2004.

[25] W. F. Warwick et N. A. Tisdale, « Morphological deformities in Chironomus, Cryptochironomus, and Procladius larvae (Diptera: Chironomidae) from two differentially stressed sites in Tobin Lake, Saskatchewan », *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 45, p. 1123-1144, 1988.

[26] W. S. Hummers et R. E. Offeman, « Preparation of Graphitic Oxide », vol. 80, nº 6, p. 1339, 1958.

[27] B. Lobato, C. Merino, V. Barranco, et T. A. Centeno, « Large-scale conversion of helical-ribbon carbon nanofibers to a variety of graphene-related materials », *RSC Adv.*, vol. 6, p. 57514-57520, 2016.

[28] L. Lagier *et al.*, « Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians », *Carbon N. Y.*, 2017.

[29] L. Tabet *et al.*, « Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. », *J. Toxicol. Environ. Health. A*, vol. 72, p. 60-73, 2009.

[30] Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (Anses), « Avis relatif à « l'évaluation des risques liés au GRAPHISTRENGTH C100 réalisée dans le cadre du programme Genesis »; Saisine n° 2007-SA-0417 », 2011.

[31] E. Canada, « Biological test method. Test for survival and growth in sediment using larvae of freshwater midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius); SPE 1/RM/32 », 1997.

[32] P. Egeler, K. S. Henry, et C. Riedhammer, « Potential effects of food addition to sediment on test conditions in sediment toxicity tests », *J. Soils Sediments*, vol. 10, p. 377-388, 2010.

[33] A. C. Vermeulen, P. C. Dall, C. Lindegaard, F. Ollevier, et B. Goddeeris, « Improving the methodology of chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: a case study in three Danish lowland streams », *Arch. für Hydrobiol.*, vol. 144, nº 1, p. 103-125, 1998.

[34] B. M. Walshe, « Feeding mechanisms of Chironomus larvae », *Nature*, vol. 160, p. 474, 1947.

[35] V. Dias, C. Vasseur, et J.-M. Bonzom, « Exposure of Chironomus riparius larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities », *Chemosphere*, vol. 71, p. 574-581, 2008.

[36] G. C. Waissi-Leinonen, I. Nybom, K. Pakarinen, J. Akkanen, M. T. Leppänen, et J. V. K. Kukkonen, « Fullerenes (nC60) affect the growth and development of the sediment-dwelling invertebrate Chironomus riparius larvae », *Environ. Pollut.*, vol. 206, p. 17-23, 2015.

[37] J. N. Mwangi *et al.*, « Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates », *Environ. Toxicol.*, vol. 31, nº 8, p. 1823-1830, 2012.

[38] L. Lagier *et al.*, « Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians », *Carbon N. Y.*, vol. 119, p. 72-81, 2017.

[39] L. J. Cote, J. Kim, V. C. Tung, J. Luo, F. Kim, et J. Huang, « Graphene oxide as surfactant sheets », *Pure Appl. Chem.*, vol. 83, nº 1, p. 95-110, 2011.

[40] S. Boncel, J. Kyzioł-Komosińska, I. Krzyżewska, et J. Czupioł, « Interactions of carbon nanotubes with aqueous/aquatic media containing organic/inorganic contaminants and selected organisms of aquatic ecosystems – A review », *Chemosphere*, vol. 136, p. 211-221, 2015.

[41] H.-H. Cho, K. Wepasnick, B. A. Smith, F. K. Bangash, D. H. Fairbrother, et W. P. Ball, « Sorption of aqueous Zn[II] and Cd[II] by multiwall carbon nanotubes: The relative roles of oxygen-containing functional groups and graphenic carbon », *Langmuir*, vol. 26, nº 2, p. 967-981, 2010.

[42] I. Chowdhury, M. C. Duch, N. D. Mansukhani, M. C. Hersam, et D. Bouchard, « Colloidal properties and stability of graphene oxide nanomaterials in the aquatic environment », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, p. 6288-6296, 2013.

[43] L. Guo, A. Von Dem Bussche, M. Buechner, A. Yan, A. B. Kane, et R. H. Hurt, « Adsorption of essential micronutrients by carbon nanotubes and the implications for nanotoxicity testing », *Small*, vol. 4, nº 6, p. 721-727, 2008.

[44] V. B. Wigglesworth, *The principles of insect physiology*, Seven. New York: Chapman and Hall, 1972.

[45] A. A. Gusev, I. A. Fedorova, A. G. Tkachev, D. V. Kuznetsov, et I. A. Polyakova, « Acute toxic and cytogenetic effects of carbon nanotubes », *Nanotechnologies Russ.*, vol. 7, nº 9-10, p. 509-516, 2012.

[46] D. Pascoe, K. A. Williams, et D. W. J. Green, « Chronic toxicity of cadmium to Chironomus riparius Meigen - effects upon larval development and adult emergence », *Hydrobiologia*, vol. 175, p. 109-115, 1989.

[47] I. Johnson et J. Murray-Bligh, « Chironomids as indicators of biological quality: present use and future potential », Bristol, 1995.

[48] G. Van Urk, F. C. M. Kerkurm, et H. Smit, « Life cycle patterns, density, and frequency of deformities in Chironomus Larvae (diptera: chironomidae) over a contaminated sediment gradient », *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 49, nº 11, p. 2291-2299, 1992.

[49] W. F. Warwick, « Morphological deformities in chironomidae (diptera) larvae from the lac St. Louis and Laprairie basins of the St. Lawrence River », *J. Great Lakes Res.*, vol. 16, nº 2, p. 185-208, 1990.

[50] W. F. Warwick, *The use of morphological deformities in chironomid larvae for biological effect monitoring*. 1990.

[51] W. F. Warwick, « Chironomidae (diptera) responses to 2800 years of cultural influence; a paleolimnological study with special reference to sedimentation, eutrophication, and contamination processes », *Can. Entomol.*, vol. 112, nº 11, p. 1193-1238, 1980.

[52] A. C. Vermeulen, « Elaborating chironomid deformities as bioindicators of toxic sediment stress: the potential application of mixture toxicity concepts », *Ann. Zool. Fennici*, vol. 32, nº 3, p. 265-285, 1995.

[53] P. P. Fu, Q. Xia, H. Hwang, P. C. Ray, et H. Yu, « Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species », *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, p. 64-75, 2014.

[54] X. Guo et N. Mei, « Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials », *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, p. 105-115, 2014.

[55] L. G. Janssens De Bisthoven, K. R. Timmermans, et F. Ollevier, « The concentration of cadmium, lead, copper and zinc in Chironomus gr. thummi larvae (Diptera, Chironomidae) with deformed versus normal menta », *Hydrobiologia*, vol. 239, nº 1981, p. 141-149, 1992.

[56] G. Meregalli, L. Pluymers, et F. Ollevier, « Induction of mouthpart deformities in Chironomus riparius larvae exposed to 4-n-nonylphenol », *Environ. Pollut.*, vol. 111, nº 2, p. 241-246, 2001.

[57] K. Park et I.-S. Kwak, « Characterization of heat shock protein 40 and 90 in Chironomus riparius larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities », *Chemosphere*, vol. 74, nº 1, p. 89-95, 2008.

[58] C. P. Madden, P. J. Suter, B. C. Nicholson, et A. D. Austin, « Deformities in chironomids larvae as indicators of pollution (pesticide)

stress », *Netherlands J. Aquat. Ecol.*, vol. 26, nº 2-4, p. 551-557, 1992.

[59] V. J. Vedamanikam et N. A. M. Shazili, « Observations of mouthpart deformities in the Chironomus larvae exposed to different concentrations of nine heavy metals », *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 91, nº 1, p. 57-63, 2009.

[60] A. Di Veroli *et al.*, « Deformities of chironomid larvae and heavy metal pollution: from laboratory to field studies », *Chemosphere*, vol. 112, p. 9-17, 2014.

[61] A. Bour *et al.*, « Impact of CeO2 nanoparticles on the functions of freshwater ecosystems: a microcosm study », *Environ. Sci. Nano*, vol. 3, nº 4, p. 830-838, 2016.

[62] L. Janssens de Bisthoven, J. Postma, A. Vermeulen, G. Goemans, et F. Ollevier, « Morphological deformities in Chironomus riparius Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations », *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 129, p. 167-179, 2001.

[63] D. A. Beckman et R. L. Brent, « Mechanisms of teratogenesis », *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 24, p. 483-500, 1984.

2. Résultats préliminaires des effets du rGO chez *Chironomus riparius*

Afin de comprendre si la toxicité du GO chez le chironome est en étroite relation avec ses fonctions oxygénées, comme c'était le cas chez le xénope (cf. Chapitre 4), la même approche expérimentale a été renouvelée. Le principe est de réduire le GO (réduction thermique sous atmosphère hydrogénée) pour ôter la plupart de ses fonctions oxygénées, notamment les époxydes. Comme précédemment, deux niveaux d'oxydation ont été obtenus via une réduction à 200°C (rGO200, en anglais « reduced graphene oxide at 200°C) et à 1000°C (rGO1000, en anglais « reduced graphene oxide at 1000°C).

Les caractéristiques physico-chimiques de ces matériaux sont d'ores et déjà mentionnées dans le Chapitre 4. Par ailleurs, l'exposition des chironomes aux rGO s'est déroulée dans les mêmes conditions normalisées que l'exposition des chironomes au GO. D'emblée, précisons que la longueur moyenne des témoins négatifs obtenue à la fin des 7 jours d'exposition est inférieure à la valeur requise par la norme (AFNOR, 2004), toutes les conditions de validité de l'essai ayant été respectées par ailleurs (taux de survie des témoins, concentration en nitrite et ammoniaque, coefficient de variation de croissance des témoins, longueur moyenne des organismes au début de l'essai). La validité de l'essai n'étant par conséquent pas établie, les résultats ne sont ici présentés qu'à titre d'essai préliminaire et doivent être considérés avec prudence.

2.1. Mortalité

Aucune mortalité significative n'est relevée suite à l'exposition des chironomes aux rGO200 et rGO1000 (Figure 1), ce qui souligne l'insensibilité des larves à ces matériaux dès le premier stade de développement. Cependant, le taux de survie des larves exposées au rGO200 montre une tendance à la diminution lorsque la concentration augmente, malgré une certaine hétérogénéité entre les réplicas. Alors que le niveau d'oxydation du rGO200 ne semble pas être en cause dans cet effet (sa teneur en oxygène est intermédiaire entre celle du GO et du rGO1000), ce dernier pourrait s'expliquer par la surface spécifique du rGO200. Effectivement, pour des raisons encore mal comprises, la surface spécifique diminue avec le traitement thermique à 200°C, alors qu'elle est partiellement retrouvée par rapport au GO d'origine lorsque le traitement thermique se poursuit jusqu'à 1000°C (253, 16, et 175 $m^2.g^{-1}$ pour le GO, le rGO200, et le rGO1000, respectivement). Même si un effet toxique est généralement attribué à une surface spécifique plus grande, c'est pourtant ici le seul paramètre qui semble varier.

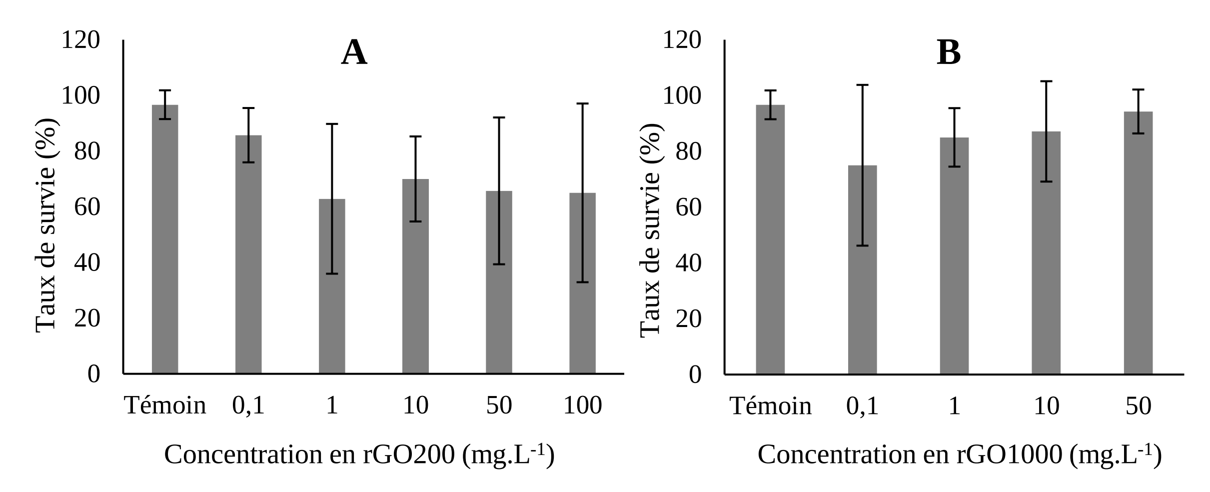


Figure 1. Taux de survie (%) des larves de chironome exposées pendant 7 jours au rGO200 (A) et au rGO1000 (B).

2.2. Inhibition de croissance

En premier lieu, la longueur moyenne du corps des chironomes témoins (témoins communs aux deux expositions de rGO) est inférieure à 9 mm à l'issue de l'expérimentation, ce qui est en désaccord avec les conditions requises par la norme (AFNOR, 2004). Les résultats montrent une inhibition de croissance significative à 100 mg.L^{-1} de rGO200 et à 50 mg.L^{-1} de rGO1000 par rapport au témoin (Figure 2). Au regard des statistiques, le rGO pourrait s'avérer moins toxique pour la croissance que ne l'est le GO (inhibiteur de croissance dès 10 mg.L^{-1}), (en tout cas avec l'unité des concentrations massiques).

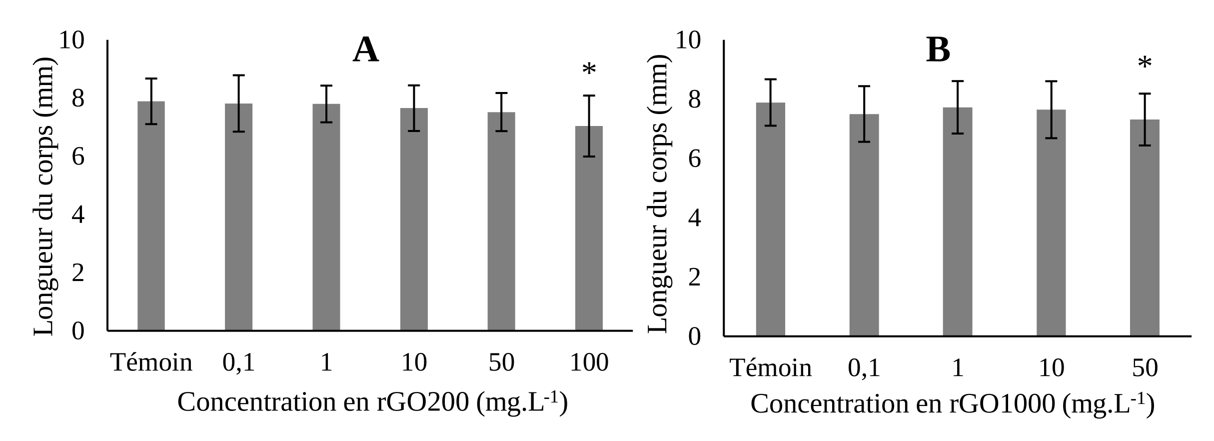


Figure 2. Longueur du corps (mm) des larves de chironome exposées pendant 7 jours au rGO200 (A) et au rGO1000 (B).

Un tel résultat pourrait s'expliquer par la perte des fonctions oxygénées de la nanoparticule initiale, ce qui pourrait alors diminuer le stress oxydatif et les autres dommages potentiellement causés. De plus, l'aspect du rGO, plus dense que le GO, ainsi que son devenir dans le milieu d'exposition, seraient susceptibles d'influencer sa biodisponibilité (Figure 3). Pour une concentration donnée, cette plus grande densité du rGO pourrait alors limiter l'éventuelle séquestration des nutriments supposée entraver la croissance. Néanmoins, ces hypothèses

demandent à être vérifiées par une nouvelle exposition des chironomes aux rGO qui soit valide selon la norme.

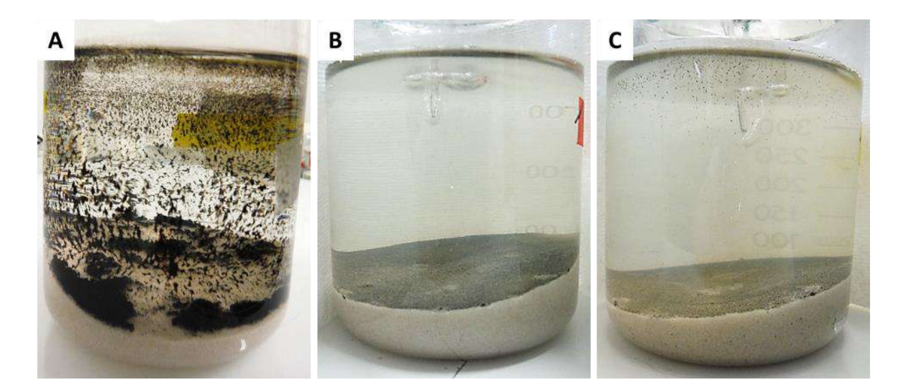


Figure 3. Milieux d'exposition des larves de chironomes au cours de l'exposition à 50 mg.L^{-1} de GO (A), de rGO200 (B) et de rGO1000 (C).

2.3. Retard de développement

Evoluant généralement parallèlement à l'inhibition de croissance, les retards de développements relevés sont très élevés chez les organismes témoins comme chez ceux exposés aux rGO200 et rGO1000 (Figure 4). Pour ce qui est de la comparaison au témoin, aucun effet significatif n'est d'ailleurs observé. Sur la seule base de cette comparaison, il semblerait que la réduction du GO permette d'inhiber sa toxicité, en accord avec les résultats préalablement obtenus chez le xénope (cf. Chapitres 4 et 5).

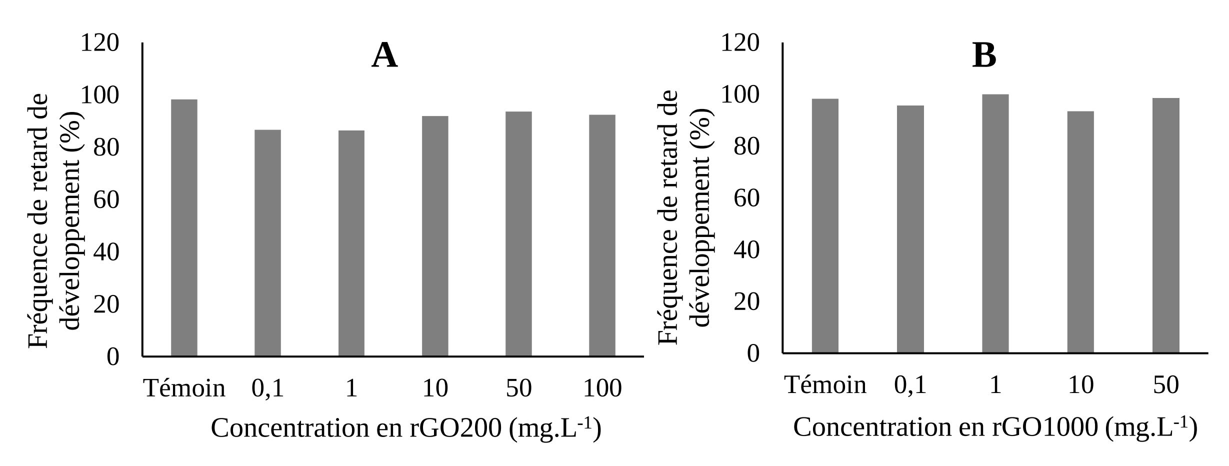


Figure 4. Fréquences de retard de développement (%) des larves de chironome exposées pendant 7 jours au rGO200 (A) et au rGO1000 (B).

2.4. Conclusion

Bien que la fiabilité de ces données demande à être confirmée par un autre essai, les résultats vont dans le sens d'une diminution de la toxicité après réduction thermique du GO, dès 200°C, ce qui correspond également à nos observations chez *Xenopus laevis*. Très peu de larves exposées aux rGO ont atteint le quatrième stade larvaire auquel la tératogénicité est

normalement observée. Aussi, des résultats relatifs aux déformations du mentum seront également à acquérir lors d'une expérimentation ultérieure, avant de pouvoir conclure sur l'absence d'effet des rGO comparés au GO.

Enfin, les résultats de l'exposition des chironomes au GO et aux rGO peuvent être comparés à ceux de l'exposition aux nanotubes de carbone double paroi, en présence de matière organique naturelle (DW-SRNOM), lesquels induisent une mortalité significative dès 1 $mg.L^{-1}$ (Lagier *et al.*, 2016).

Remerciements

Nous remercions Pauline BARBE et Bernard CLEMENT de l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (ENTPE), CNRS UMR 5023 – LEHNA (Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, 3 rue Maurice Audin, F-69518 Vaulx-en-Velin Cedex France) pour les souches initiales de chironomes qu'ils ont fournies, qui ont permis de constituer notre élevage et de mener nos expériences.

Références bibliographiques

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Lagier, L., Mouchet, F., Cadarsi, S., Mottier, A., Bour, A., Verneuil, L., Silvestre, J., Flahaut, E., Sarrieu, C., Pinelli, É., Gauthier, L., 2016. Ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes in aquatic organisms: single-species and mesocosm assays, in: Poster présenté durant la 26ème rencontre annuelle de la SETAC Europe (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) du 22 au 26 mai 2016 (Nantes, France).

CHAPITRE 7



MÉSOCOSME : APPROCHE ENVIRONNEMENTALE DES EFFETS DE L'OXYDE DE GRAPHÈNE – PRÉSENTATION DU SYSTÈME ET PREMIERS RÉSULTATS

Résumé :

L'impact de l'oxyde de graphène (GO) a été étudié dans un écosystème expérimental d'eau douce. L'expérimentation a été menée en mésocosme, en recréant des conditions pertinentes sur le plan environnemental. La toxicité du GO a été étudiée après exposition à de faibles doses (0,05 et 0,1 $mg.L^{-1}$) à travers des biomarqueurs divers, incluant la décomposition foliaire de la litière, la mortalité, la croissance, le développement et la tératogénicité chez *Chironomus riparius*, et la mortalité, la croissance, et la génotoxicité chez *Pleurodeles waltl*.. D'autres résultats relatifs à la diversité des communautés bactériennes sont actuellement en cours d'acquisition.

La réponse des organismes est variable. En fin d'expérimentation, une décomposition significative des feuilles est observée à la plus faible concentration d'exposition (0,05 $mg.L^{-1}$). Elle pourrait être attribuée à l'action conjointe des microorganismes et des chironomes, mais l'analyse des communautés bactériennes s'avère nécessaire pour le confirmer et mettre en évidence des fonctions écosystémiques. D'autre part, aucun effet du GO n'est observé chez le chironome. Le pleurodèle montre quant à lui une génotoxicité significative à 0,1 $mg.L^{-1}$ par rapport au groupe témoin. Des hypothèses sont émises concernant l'origine (voies d'exposition) de cette toxicité chez le prédateur.

Cette étude montre que la décomposition de la litière et la formation de micronoyaux chez le pleurodèle sont des marqueurs sensibles de l'impact environnemental du GO dans ces conditions d'exposition.

1. Introduction

Les matériaux de la famille du graphène ont des propriétés uniques et présentent un intérêt croissant dans des domaines variés (Cui *et al.*, 2012; Loh *et al.*, 2010; Novoselov *et al.*, 2012). L'oxyde de graphène (GO) s'avère particulièrement attractif du fait de sa capacité de dispersion dans de nombreux solvants qui facilite sa manipulation (Paredes *et al.*, 2008). Malgré les bénéfices que peut apporter l'utilisation de nanoparticules telles que le GO, leurs risques environnementaux et sanitaires potentiels ne doivent pas être négligés, d'autant plus que leur production augmente. Les études de toxicité *in vitro* tendent à se multiplier, de même que les études de biocompatibilité du GO chez des modèles murins (Ema *et al.*, 2017; Ou *et al.*, 2016). Néanmoins, une fois libérées, les nanoparticules de carbone (NPC) comme le GO sont susceptibles de rejoindre les écosystèmes aquatiques qui représentent un ultime réceptacle pour la plupart des contaminants (Gottschalk et Nowack, 2011; Peralta-Videa *et al.*, 2011). Les études dédiées à l'impact des nanoparticules de carbone (NPC) sur les espèces aquatiques sont souvent peu représentatives des conditions environnementales. A notre connaissance, la littérature ne fait pas encore état de l'impact des NPC au sein d'un écosystème complexe. Il est donc important de développer des outils intégrateurs tenant compte de cette complexité, puisque de nombreux paramètres biotiques et abiotiques peuvent moduler la toxicité des nanoparticules (Bour *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2014).

Afin d'évaluer le risque écotoxicologique du GO en conditions relativement réalistes sur le plan environnemental, la présente étude se propose d'utiliser des mésocosmes mettant en jeu des interactions interspécifiques (compétition et prédation, par exemple), de la production de biomasse et de la décomposition de litière foliaire. Cette dernière est reconnue comme un outil pertinent pour apprécier le fonctionnement et la santé d'un écosystème dulçaquicole (Pascoal *et al.*, 2005; Pascoal et Cassio, 2004). Elle implique notamment l'action (minéralisation ou broutage) des micro-organismes et des invertébrés (Graça *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2017). A travers une exposition chronique au GO en mésocosme, cette étude se penche sur l'impact de la nanoparticule sur la dégradation de feuilles d'aulne par les communautés microbiennes et la larve du macroinvertébré benthique *Chironomus riparius*. De plus, les présents travaux suivent l'évolution des paramètres physico-chimiques de l'eau, incluant les concentrations en nitrites et nitrates, lesquels peuvent s'avérer toxiques en cas de concentrations trop importantes. Le cycle de l'azote, au cours duquel les composés azotés initialement présents sous forme d'ammoniaque (NH_3) ou d'ammonium (NH_4^+) sont oxydés en nitrites (NO_2^-), eux-mêmes

oxydés en nitrates (NO_3^-) par la suite, peut prendre plusieurs semaines. Il est donc important d'effectuer un suivi régulier des différents composés azotés cités précédemment.

L'objectif de cette étude est aussi d'évaluer la toxicité du GO le long d'une chaine trophique expérimentale. Pour cela, la diatomée benthique *Nitzschia palea*, à la base de nombreuses chaines alimentaires, a été choisie pour compléter le compartiment primaire et représenter une source de nourriture pour les consommateurs primaires. Ces derniers sont quant à eux représentés par *C. riparius* et *Xenopus laevis*. Le chironome est représentatif de nombreux écosystèmes dulçaquicoles et est largement utilisé en écotoxicologie. Ici, la toxicité du GO est étudiée chez cette espèce à travers différents paramètres de toxicité, tels que la mortalité, la croissance, le retard de développement, et la tératogénicité (évaluée à partir des déformations du mentum). Les chironomes sont aussi connus pour leur activité de bioturbation, de broutage du biofilm et de filtration, ce qui fait d'eux des vecteurs potentiels de toxicité pour les maillons trophiques supérieurs. De même, les larves de *Xenopus laevis* peuvent représenter une source de contamination trophique potentielle puisque ce sont des filtreurs actifs de la colonne d'eau. Ainsi, les prédateurs pourraient être impactés par voie directe ou trophique. Ceux-ci sont représentés par les larves de l'amphibien *Pleurodeles waltl.*, généralement utilisées comme bioindicateurs de contaminants génotoxiques auxquels elles sont sensibles (Djomo *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 1993; Gauthier et Mouchet, 2017). La mortalité, la croissance et la génotoxicité sont étudiées chez cette espèce afin d'évaluer l'impact du GO en mésocosme, par comparaison à l'exposition de ces organismes en conditions monospécifiques.

2. Matériels et méthodes

2.1. Mise en place de l'expérimentation en mésocosme

Neuf mésocosmes ont été réalisés dans de grands aquariums en verre (60 x 30 x 30 cm, L x l x H) remplis avec du sédiment reconstitué (6,5 L de sable contenant 89% de silice, 10% de kaolinite, et 1% de carbonate de calcium, soit 4 cm de hauteur environ) et 40 L d'eau de Volvic®. Ces mésocosmes ont été nommés M1 à M9 et correspondent à trois conditions différentes (chacune d'elle étant tripliquée) : les témoins (M1, M4, M7), la condition d'exposition à 0,05 $mg.L^{-1}$ de GO (M2, M5, M8), et la condition d'exposition à 0,1 $mg.L^{-1}$ de GO (M3, M6, M9). Les cuves 1 à 9 ont été placées dans la salle d'exposition dans cet ordre (intercalage des conditions).

Chaque mésocosme fonctionne en système fermé et est équipé d'un système de recirculation de l'eau connecté à une pompe (EHEIM, 10 $L.min^{-1}$, 10 W, 50 Hz, ~230 V). Les aquariums ont

été préalablement dimensionnés pour permettre à la fois une hauteur d'eau adaptée aux organismes tout en garantissant un écoulement et un débit adéquats permettant une bonne oxygénation du milieu, sans pour autant en augmenter la turbidité. Le niveau d'eau initial a été mesuré afin d'être ultérieurement complété par de l'eau déionisée pour pallier à l'évaporation. De plus, des néons (JBL Solar ultra, NATUR 9000°K LT 24 WT5-HQ) de hauteurs réglables ont été individuellement placés au-dessus de chaque cuve afin de permettre un développement ultérieur homogène des diatomées. Enfin, la température de l'eau a été maintenue à 22 ± 1°C pendant toute la durée de l'expérience (contrôlée à l'aide d'un thermomètre placé dans les cuves).

2.2. Introduction des organismes

Dans chaque aquarium, une même chaine trophique a été mise en place, en suivant une introduction séquentielle des organismes comme représenté par la Figure 1.

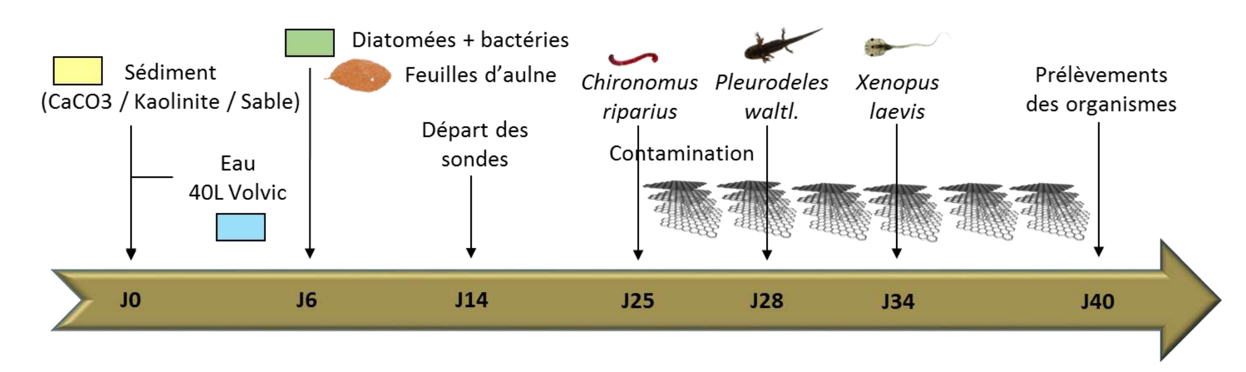


Figure 1. Représentation schématique de la chronologie d'introduction des différents éléments biotiques (diatomées, bactéries, feuilles d'aulne, chironomes, pleurodèles, xénopes) et abiotiques (sédiment, eau, oxyde de graphène) lors de l'expérimentation en mésocosme. Les chironomes ont été initialement introduits dans chaque mésocosme au nombre de 800, et les pleurodèles et les xénopes au nombre de 15 et 20, respectivement.

Le démarrage du mésocosme (J0) correspond à la mise en eau de ce dernier. Au bout de 6 jours, l'introduction des producteurs primaires (diatomées et feuilles d'aulne) et des bactéries a été réalisée. Les diatomées (*Nitzschia palea*) proviennent d'une souche cultivée au laboratoire Ecolab dans du milieu de culture CHU 10 comme décrit par Verneuil *et al.* (2014). Elles ont été introduites dans chaque cuve à raison d'une concentration de $2,5.10^5$ cellules par litre. Les feuilles d'aulne ont pour leur part été ramassées au début de l'automne (Chemin de Ramade, Haute-Garonne, France, 43°31'04.2''N 1°25'32''E), puis rincées à l'eau distillée et autoclavées (afin de limiter l'apport de micro-organismes non intentionnels), avant d'être introduites dans les mésocosmes à raison d'une quinzaine de feuilles par cuve. L'inoculum bactérien a quant à lui été fourni par le LIEC (UMR 7360, Metz, France) et correspond à des bactéries naturellement retrouvées en rivière (Bour, 2015). Les micro-organismes ont d'abord été

recueillis sur des filtres, puis centrifugés et suspendus dans du glycérol à 50 % ($2{,}7.10^{10}$ bactéries.mL^{-1}), et enfin conservés à -80°C au LIEC avant leur envoi. Pour les introduire dans les mésocosmes, 1 mL de cette préparation a été mis à incuber dans 2 L d'eau de Volvic® (72h, 21°C). Un volume de 100 mL a ensuite été introduit dans chaque mésocosme. Une vingtaine de jours est alors laissée aux organismes pour se développer et permettre la formation d'un biofilm suffisant pour nourrir les consommateurs (chironomes et xénopes).

Au bout de 25 jours de mise en route, les chironomes sont introduits à raison de 800 individus par mésocosme. Les larves ainsi introduites respectent les mêmes critères de taille (1,8 ± 0,3 mm de long), d'âge (48h) et d'élevage que celles utilisées dans les essais monospécifiques (cf. Chapitre 6). Les pompes sont arrêtées le jour de l'introduction des chironomes (J25) de sorte à les laisser atteindre plus facilement le sédiment sans qu'ils ne soient entrainés par le courant. Trois jours sont laissés aux larves pour s'installer dans le sédiment et commencer leur croissance, avant qu'elles ne servent de nourriture aux prédateurs. Ces derniers, les pleurodèles, sont donc introduits à J28, à un stade larvaire plus avancé que celui des essais monospécifiques mais antérieur à la métamorphose (stade 55b de la table de développement de Gallien & Durocher (1957), avant disparition des branchies). 15 larves de pleurodèle sont introduites dans chaque mésocosme. Enfin, 20 larves de xénope sont distribuées dans chaque mésocosme à J34 afin de complémenter l'apport en nourriture des pleurodèles. L'ensemble de la chaîne trophique ainsi constituée et du système expérimental est représenté par la Figure 2.

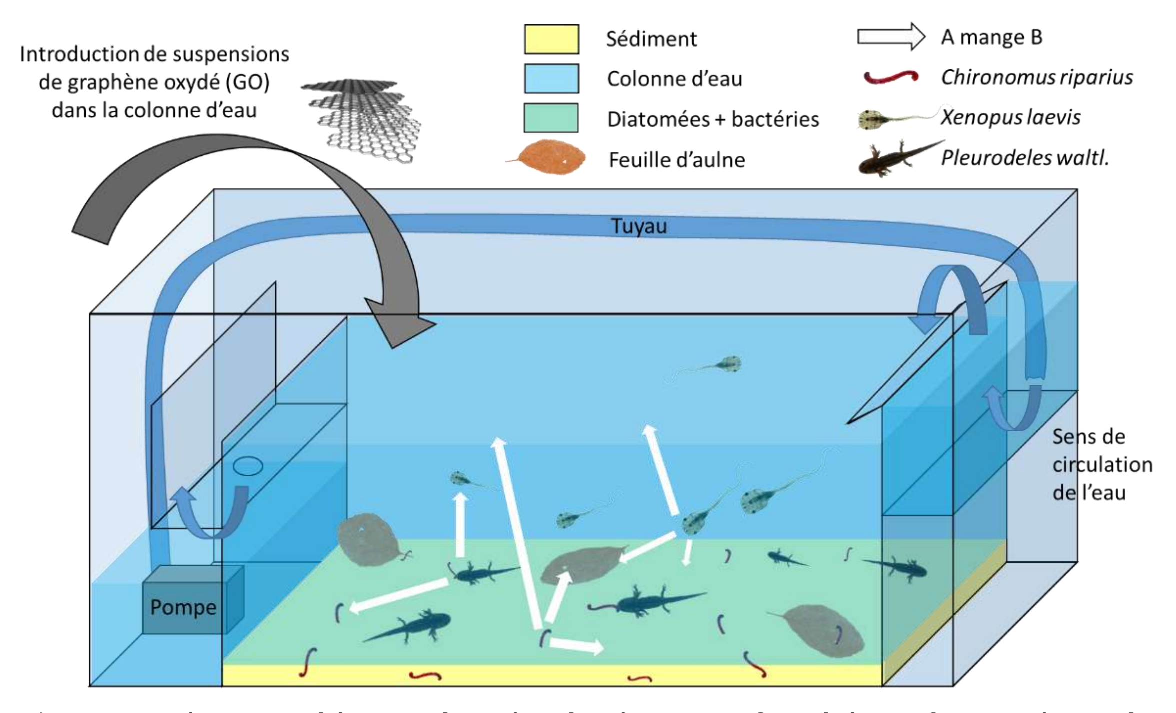


Figure 2. Représentation schématique du système de mésocosme et de sa chaîne trophique expérimentale.

2.3. Préparation du GO et procédure de contamination

Le GO a suivi le même protocole de préparation que précédemment décrit pour les essais monospécifiques. Brièvement, la quantité voulue de GO (nxGOH_37B, fourni par le groupe Antolin) a été pesée avant d'être dispersée dans de l'eau déionisée pour constituer une suspension mère. En fonction de la concentration visée, des volumes bien définis de cette suspension mère ont été échantillonnés sous cuve à ultrason (Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 kHz) et introduits dans des tubes en verre individuels, complétés à 40 mL avec de l'eau déionisée.

Le mésocosme fonctionnant en circuit fermé, la contamination par le GO s'est faite de manière séquentielle en introduisant chaque jour une fraction de contaminant, de sorte à atteindre la concentration finale de 0,05 ou 0,1 mg.L^{-1} de GO. Ainsi, pendant 15 jours à compter de l'introduction des chironomes (J25), chaque mésocosme contaminé a reçu 1/15ème de la concentration finale, soit l'équivalent de 0,15 mg par jour pour la condition 0,05 mg.L^{-1}, et 0,3 mg par jour pour la condition 0,1 mg.L^{-1}. Pour cela, chaque suspension de GO a été dispersée pendant 2 minutes par ultrasons (Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 kHz) juste avant d'être introduite dans le milieu.

2.4. Mesures semi-continues des paramètres physico-chimiques de l'eau

La température, le pH, l'oxygène dissous, la conductivité et le potentiel red-ox ont été mesurés à raison d'une valeur toutes les 30 minutes pendant l'expérience, à partir du 14ème jour (J14) de mise en route (c'est-à-dire de la mise en eau : J0) des mésocosmes. Ces mesures ont été effectuées à l'aide de sondes Libelium®, reliées à des boitiers électroniques stockant provisoirement les données avant récupération de celles-ci par ordinateur (*via* le logiciel Smart Water). L'utilisation de ce matériel Libelium® étant spécifique (une formation est nécessaire) et nouvelle au laboratoire Ecolab, les données sont encore en cours d'acquisition.

2.5. Mesures ponctuelles des concentrations en nitrites et nitrates

Les concentrations en nitrites et nitrates ont été mesurées à partir d'échantillons de la colonne d'eau prélevés de manière ponctuelle, environ tous les 3 jours, à partir du 19ème jour (J19) de la mise en eau des cuves (soit avant l'introduction des animaux) jusqu'à la fin de l'expérience. Les échantillons ont été filtrés et congelés, puis analysés selon la norme NF EN ISO 13395 par colorimétrie en flux continu (ALPKEM IV). Le matériau de référence certifié CRM utilisé pour

cela était l'ion 915. Les résultats obtenus ont été statistiquement comparés aux résultats du groupe témoin au moyen d'un test de Kruskal Wallis grâce au logiciel SigmaPlot 12.0.

2.6. Analyse de l'évolution des communautés bactériennes

La structure des communautés bactériennes est actuellement à l'étude au laboratoire Ecolab. Pour cela, 100 mL (2 x 50 mL) d'eau et 100 mL (2 x 50 mL) de sédiment ont été prélevés tous les trois jours dans chaque mésocosme à partir de l'introduction des chironomes (J25) jusqu'à la fin de l'exposition, puis filtrés (0,45 µm) et conservés à 4°C avant. Les échantillons sont ensuite traités pour en extraire l'ADN grâce au PowerSoil® DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories) et aux instructions du fournisseur. Cette extraction est suivie par un séquençage de l'ADN ribosomique 16S à l'aide d'amorces universelles. La présence et l'abondance relative des taxons bactériens de chaque condition expérimentale seront comparées à la condition témoin pour évaluer l'influence du GO sur l'abondance des espèces, des genres ou des groupes phylogénétiques. En particulier, les groupes fonctionnels de bactéries seront étudiés incluant les bactéries oxydantes de l'ammoniac et des nitrites. De plus, l'abondance et l'expression de certains gènes fonctionnels (relatifs à nitrification ou à la dénitrification par exemple) seront également quantifiées par qPCR ou qRT-PCR.

2.7. Mesure de la dégradation foliaire

A la fin de l'exposition (J40), les feuilles de chaque mésocosme sont récupérées et rincées avec de l'eau distillée pour éliminer le biofilm. Les feuilles d'aulne sont ensuite disposées sur des feuilles blanches de papier cartonné et recouvertes de tissu (afin d'éviter toute adhésion) puis de papier absorbant. Une pression est appliquée afin de faire sécher les feuilles à plat, tandis que le papier absorbant est régulièrement remplacé par du papier sec pour éviter toute moisissure. Une fois sèches, les feuilles sont scannées afin de travailler à partir de leur image numérisée (Figure 3).

La surface foliaire est ainsi mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Le logiciel permet d'obtenir la surface consommée de la feuille ainsi que sa surface non-consommée. Les proportions obtenues peuvent être exprimées en pixels ou en pourcentages. La comparaison statistique des résultats (pourcentages) de dégradation foliaire par rapport au témoin est ensuite effectuée par une Anova *via* le logiciel R.

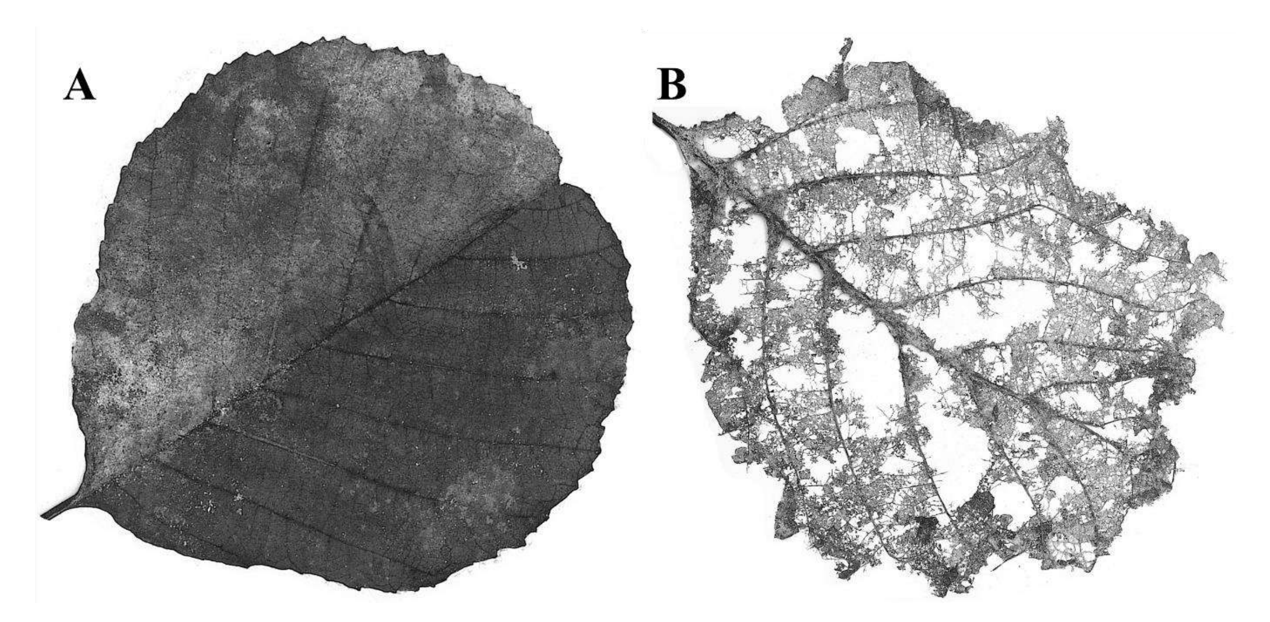


Figure 3. Exemples de feuilles d'aulne scannées dont la surface est prête à être analysée. A : exemple d'une feuille pas ou peu dégradée en fin d'exposition. B : exemple d'une feuille relativement dégradée en fin d'exposition

2.8. Biomarqueurs mesurés chez les chironomes et les pleurodèles

A l'issue de l'exposition, les larves de chironomes et de pleurodèles ont fait l'objet de diverses analyses. Les biomarqueurs étudiés chez ces deux espèces étant les mêmes que ceux étudiés lors des essais monospécifiques, leurs modalités d'analyse seront ici seulement évoquées (les Chapitres 4 et 6 fournissent plus de détails sur le sujet). Ainsi, les pleurodèles ont fait l'objet de mesures relatives à la mortalité, au taux de croissance, et à la génotoxicité. Les chironomes ont quant à eux été utilisés pour l'analyse de la mortalité, de la croissance, du retard de développement, et de la tératogénicité. Les résultats ont été traités statistiquement comme précédemment évoqués (Chapitres 4 et 6).

3. Premiers résultats

Tous les résultats issus de l'exposition au GO en mésocosme n'ont pas encore été acquis à ce jour, notamment les résultats relatifs à l'évolution des communautés bactériennes, ainsi que les données concernant les paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés par les sondes Libelium® (température, pH, conductivité, oxygène dissous, potentiel red-ox). De ce fait, seront ici présentés les premiers résultats obtenus, à savoir les données de mesures ponctuelles en nitrates et nitrites, les données relatives à l'impact du GO sur les chironomes et les pleurodèles, ainsi que les données relatives à la consommation des feuilles d'aulne. Les xénopes ont quant à eux été totalement consommés par les pleurodèles et sont donc exclus de toute analyse de biomarqueur.

3.1. Concentrations en nitrites et nitrates

Les résultats de concentrations en nitrites et nitrates obtenus sont présentés par la Figure 4. Aucune différence significative de concentration en nitrates ou nitrites dans les mésocosmes à 0,05 et 0,1 mg.L^{-1} de GO n'est observée par rapport au témoin, et ce quel que soit le jour. Les écarts types traduisent une certaine hétérogénéité entre les réplicas. Néanmoins, au cours du temps, il apparait une augmentation de la concentration en nitrites dans l'ensemble des mésocosmes jusqu'à J34 (J36 pour la concentration 0,1 mg.L^{-1}), avant de re-diminuer à la fin de l'expérience. La concentration en nitrates diminue quant à elle tout au long de l'expérience quelle que soit la condition, et ce de manière significative à partir du 36ème jour par rapport au premier jour de mesure (J19).

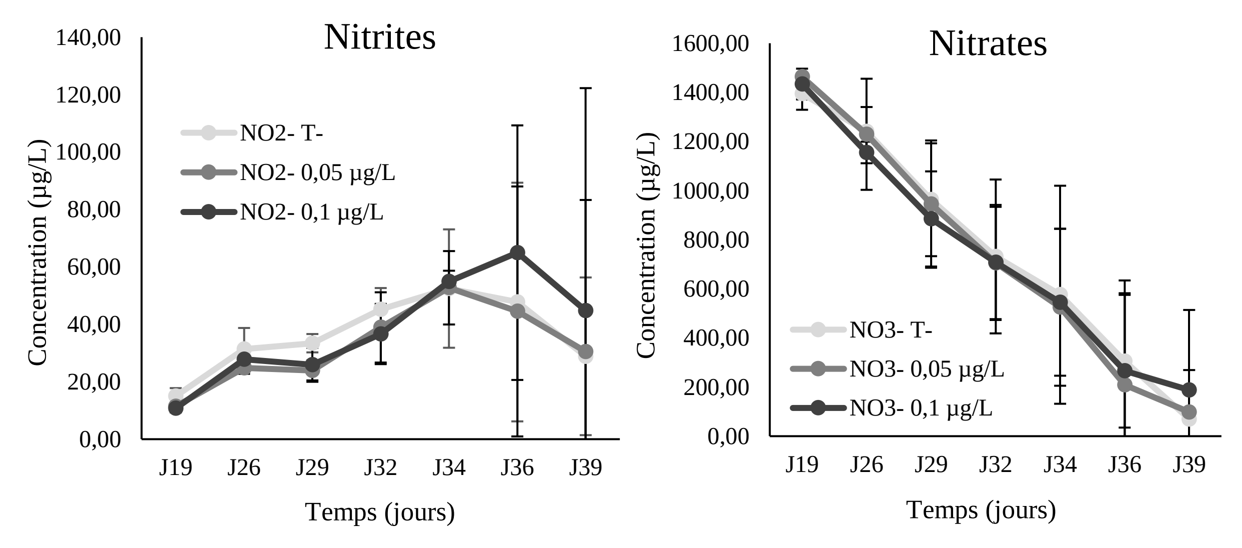


Figure 4. Concentration en nitrites et nitrates dans les mésocosmes depuis le 19ème jour du lancement (avant introduction des chironomes à J25, des pleurodèles à J28 et des xénopes à J34) jusqu'au dernier jour d'exposition (J39).

3.2. Effet du GO sur la dégradation des feuilles d'aulnes

Les résultats de la dégradation foliaire, exprimés en pourcentage de feuille consommée, sont présentés par la Figure 5. Il apparait que la consommation des feuilles est significativement plus importante pour les mésocosmes contaminés à 0,05 mg.L^{-1} de GO que dans les mésocosmes témoins. Cette tendance se retrouve à 0,1 mg.L^{-1} de GO mais n'est plus significativement différente du témoin.

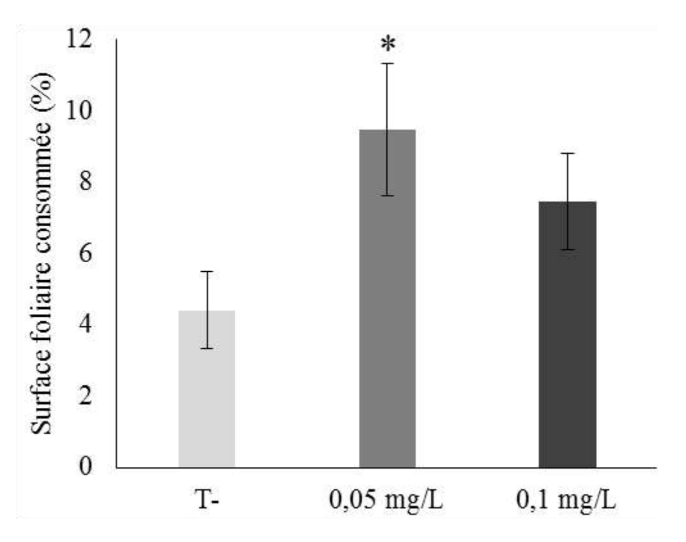


Figure 5. Surface foliaire consommée (%) au sein des mésocosmes. « * » indique une différence significative par rapport au témoin.

3.3. Effets du GO chez le chironome

Les résultats relatifs à la mortalité, à la croissance et au retard de développement de *Chironomus riparius* sont regroupés dans la Figure 6. A l'issue de l'exposition, aucune mortalité significative n'est relevée par rapport au témoin. Le taux moyen de survie des larves de chironome est inférieur à 10 % quelle que soit la condition expérimentale. L'importance des écarts types souligne une certaine hétérogénéité entre les réplicas en regard du paramètre de mortalité.

Concernant la croissance des larves, les mêmes observations peuvent être faites, et les résultats ne mettent pas en évidence de différence significative par rapport au témoin. Quelle que soit la condition, la taille moyenne des larves n'atteint pas 9 mm à la fin de l'expérience, soit 15 jours après l'introduction des larves dans les mésocosmes.

Les fréquences de retard de développement des individus exposés au GO ne montrent pas non plus de différence significative par rapport au groupe témoin, quelle que soit la concentration. Les témoins présentent d'emblée un taux élevé de retard de développement de 40 %. Ces fréquences correspondant au rapport du nombre de chironomes de stade inférieur à 4 sur le nombre total de chironomes (multiplié par 100), la Figure 6.C ne présente pas d'écart type. Par ailleurs, aucune émergence n'a été constatée, et seuls quelques individus (dont le nombre, négligeable, n'est pas pris en compte dans les résultats) ont été retrouvés au stade de nymphe, indépendamment de la condition d'exposition.

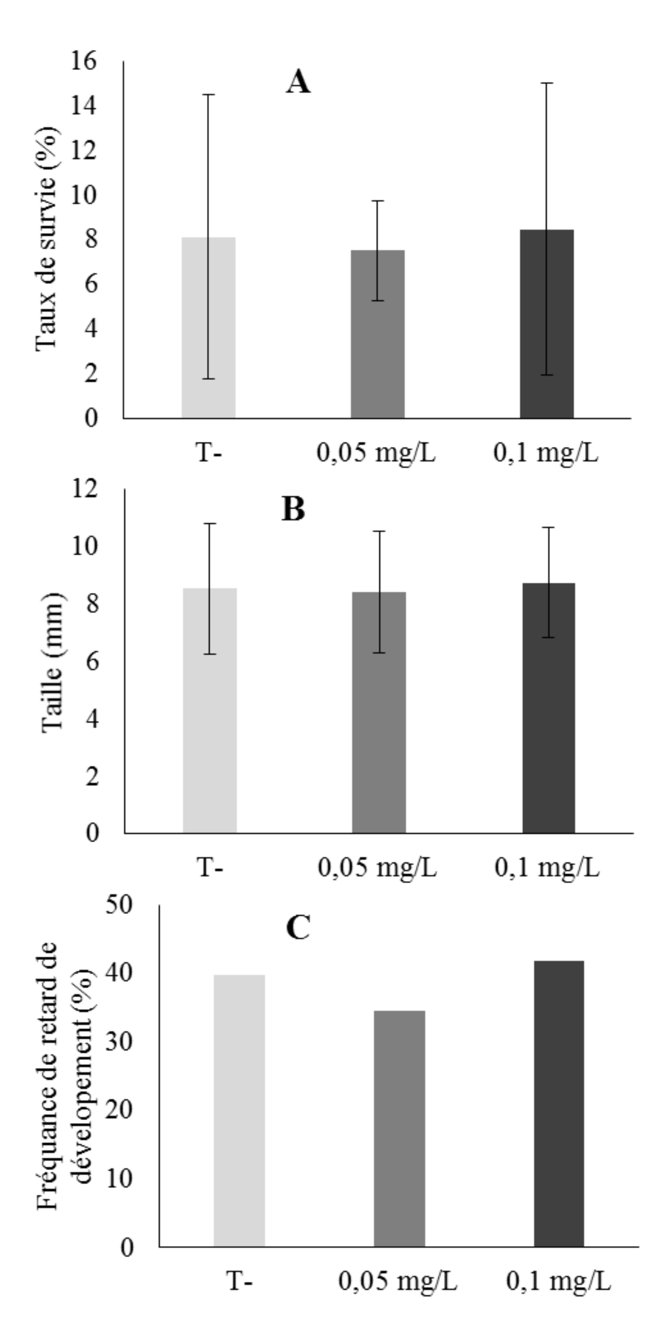


Figure 6. Résultats de l'exposition au GO chez le chironome en mésocosme sur le taux de survie (A), la croissance (B) et la fréquence de retard de développement (C).

D'autre part, la tératogénicité a également été étudiée chez le chironome. Les résultats, présentés par la Figure 7, ne mettent pas en évidence de tératogénicité significative chez les larves exposées au GO (0,05 et 0,1 mg.L^{-1}) par rapport aux larves témoins, qu'il s'agisse des fréquences d'apparition des déformations ou bien du score de sévérité qui leur est attribué. La fréquence des déformations correspondent au rapport du nombre de chironomes de mentum déformé sur le nombre total de chironomes (multiplié par 100), ce qui explique pourquoi la Figure 7.A ne présente pas d'écart type. Les scores de sévérité moyens par individu sont de l'ordre de 4 pour les larves du groupe témoin, et presque la totalité des individus sont atteints de déformations dans ce même groupe.

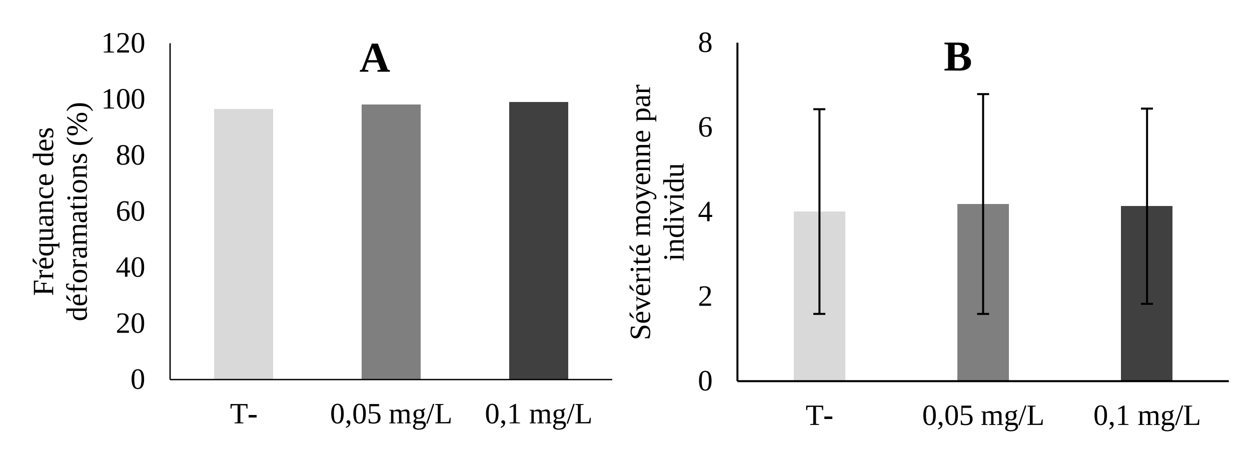


Figure 7. Tératogénicité observée sur le mentum des chironomes exposés au GO en mésocosme. A : fréquence de déformation (%) des menta. B : sévérité moyenne des déformations, par individu.

3.4. Effets du GO chez le pleurodèle

Aucune mortalité des larves de pleurodèle n'a été observée dans les mésocosmes, quelle que soit la condition d'exposition. Par contre, les résultats de génotoxicité montrent une tendance à l'augmentation de la formation de micronoyaux en fonction de la dose (Figure 8). Cette génotoxicité devient significative par rapport au témoin chez les larves exposées à 0,1 mg.L^{-1}. Le taux de mitoses observées chez les larves exposées au GO ne permet pas de mettre en évidence une différence significative par rapport au taux de mitoses chez les individus témoins, malgré une tendance à l'augmentation à 0,01 mg.L^{-1} de GO. Remarquons que le taux de divisions cellulaires est extrêmement faible (inférieur à 1‰) en fin d'exposition quelle que soit la condition expérimentale.

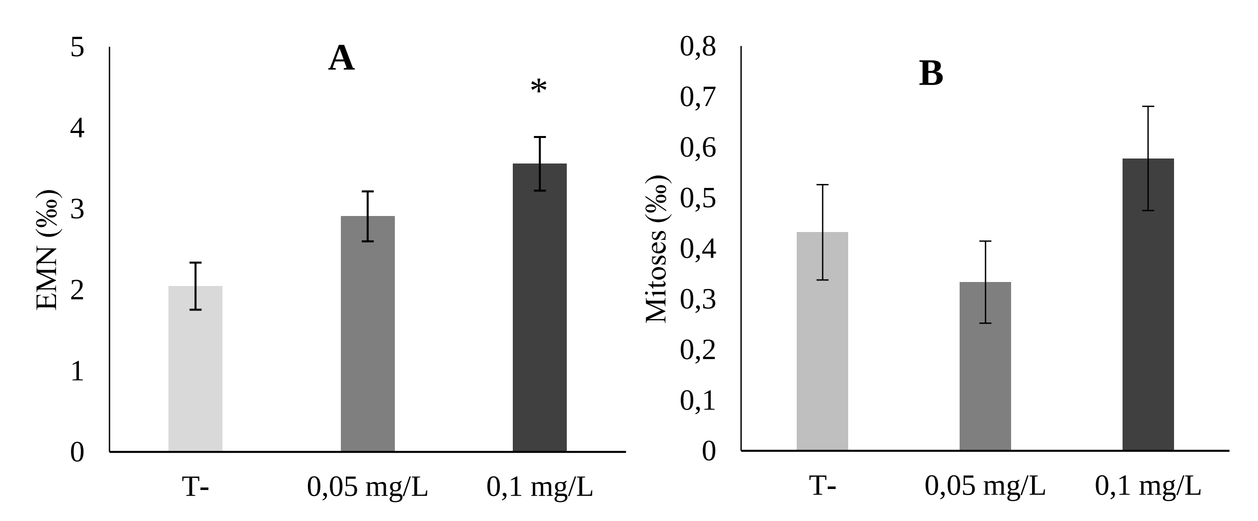


Figure 8. (A) Génotoxicté (érythrocytes micronucléés, EMN ‰) et (B) mitoses érythrocytaires (‰) chez les pleurodèles exposés au GO en mésocosme.

D'autre part, aucune inhibition de croissance n'a été observée chez le pleurodèle après exposition au GO (aux deux concentrations), par comparaison aux larves du témoin. La taille

moyenne des organismes en fin d'exposition était comprise entre 4,60 et 4,72 cm toute condition d'exposition confondue.

4. Premiers éléments de discussion

Dans un contexte d'évaluation du risque environnemental associé aux nanoparticles manufacturées, rares sont les travaux s'attachant à étudier les interactions entre organismes de niveaux trophiques distincts dans un écosystème complexe (Auffan *et al.*, 2014; Bour *et al.*, 2015; Ferry *et al.*, 2009; Kulacki *et al.*, 2012). La présente étude se penche sur l'effet du GO en mésocosme, chez des espèces représentatives de trois niveaux trophiques : les producteurs/consommateurs primaires (algues unicellulaires *Nitzschia palea*, litière de feuilles d'aulnes, et communautés bactériennes), les consommateurs primaires (les larves de *Chironomus riparius*, et de manière très ponctuelle car rapidement consommées, les larves de *Xenopus laevis*), et les consommateurs secondaires ou prédateurs (les larves de *Pleurodeles waltl*.). Se voulant réaliste sur le plan environnemental -bien que reposant sur un circuit fermé- notre approche vise à simuler un déversement continuel de GO dans le milieu aquatique, à faible dose, de sorte à atteindre les concentrations finales de 0,05 et de 0,1 $mg.L^{-1}$. La toxicité du GO dans les mésocosmes est régie par le comportement des nanoparticules (dispersion, agrégation, sédimentation, etc.), mais aussi par les interactions biologiques. L'évaluation du devenir du GO dans un milieu complexe se heurtant à un certain nombre de verrous technologiques, notre étude cible la mesure des réponses biologiques chez les organismes. Les effets observés varient selon l'espèce en question et sont ici présentés par niveau trophique.

4.1. Effets du GO chez les producteurs/consommateurs primaires

Les données relatives à l'évolution des communautés bactériennes et de la croissance algale en présence de GO sont en cours d'acquisition. Cependant, les mesures des concentrations en nitrites et nitrates de la colonne d'eau (Figure 4) soulignent une importante consommation des nitrates au fil du temps. De ce fait, cette consommation pourrait être attribuée au développement du compartiment des « producteurs primaires » dont font partie les diatomées (Robert et Maestrini, 1986), en accord avec nos observations visuelles (apparition d'un biofilm au fil du temps). Ce développement concorderait avec la diminution du nombre de consommateurs de diatomées, les chironomes, (et dans une moindre mesure, les xénopes, peu nombreux et rapidement prédatés par les pleurodèles). D'autre part, la diminution du nombre de chironomes (et xénopes) correspond à une plus faible quantité de déchets produits (excrétions), ce qui pourrait conduire à une diminution de la production de nitrites et nitrates par les bactéries

nitrifiantes (par exemple, *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrobacter*, etc.). En toute hypothèse, les communautés bactériennes pourraient donc évoluer en faveur d'une diminution des bactéries nitrifiantes au profit des bactéries dénitrifiantes (réduisant les nitrates en nitrites). Une augmentation des nitrites en toute fin d'exposition tandis que les nitrates continuent de diminuer irait dans le sens de cette hypothèse. Néanmoins, les valeurs de nitrates et nitrites sont similaires quelle que soit la condition (0,05, 0,1 $mg.L^{-1}$ de GO, ou témoin). Par ailleurs, bien que n'ayant pas encore été traités dans la présente étude, les paramètres physico-chimiques (température, pH, oxygène dissous, conductivité, potentiel red-ox) semblent peu susceptibles de varier en fonction des concentrations de GO, comme déjà observé dans d'autres mésocosmes contaminés aux nanotubes de carbone double-paroi en présence de matière organique naturelle (données non publiées), ou aux nanoparticules d'oxyde de cérium (Bour *et al.*, 2016a).

A ce stade, le GO pourrait paraitre sans effet chez les producteurs/consommateurs primaires, s'il ne fallait prendre en compte les autres constituants du milieu. Ainsi, une dégradation significativement plus élevée des feuilles d'aulne issues des mésocosmes contaminés à 0,05 $m.L^{-1}$ de GO a été observée par rapport aux feuilles des mésocosmes témoins (Figure 5). Cette dégradation des feuilles pourrait éventuellement être attribuée à l'action des bactéries, ou bien à leur consommation par les chironomes (en dans une moindre mesure, par les xénopes). Le GO pouvant, dans certaines conditions, présenter un effet antimicrobien (Liu *et al.*, 2011), les bactéries responsables de la dégradation de la litière pourraient être davantage impactées avec l'augmentation de la concentration. Ceci permettrait d'expliquer l'absence de dégradation foliaire significative à 0,1 $mg.L^{-1}$ de GO. Mais comment expliquer que dans un milieu exempt de GO (le témoin), la dégradation soit moins importante qu'à 0,05 $mg.L^{-1}$ de GO ? Paradoxalement, certaines études rapportent aussi que le GO peut favoriser la croissance de certaines bactéries qui s'en servent de support pour proliférer (Guo *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2011). L'analyse des communautés bactériennes (composition, nombre, activité, et/ou fonction) devrait permettre de répondre à ces interrogations. Pour ce qui est des chironomes, leur nombre ne varie pas significativement d'une condition à l'autre (Figure 6). Hypothétiquement, l'augmentation de dégradation foliaire à 0,05 $mg.L^{-1}$ pourrait résulter d'une modification du comportement nutritif des chironomes par rapport au témoin. Hypothétiquement, un moindre biofilm dans les mésocosmes contaminés à 0,05 $m.L^{-1}$ de GO pourrait obliger les chironomes à consommer plus de feuilles. Ou bien, cette apparente modification de comportement pourrait elle-même dépendre de la pression exercée par les prédateurs, si ceux-ci venaient à être perturbés en fonction de la dose.

4.2. Effets du GO chez le consommateur primaire : *Chironomus riparius*

Comme évoqué précédemment, le GO n'affecte pas la survie des chironomes, puisqu'aucune différence significative de mortalité n'est observée par comparaison au témoin. Ceci est en accord avec les résultats de l'essai monospécifique effectué chez le même organisme, où le GO n'avait pas induit de mortalité significative à 0,1 mg.L^{-1} (ni aux concentrations supérieures testées) par rapport au témoin (cf. Chapitre 6). En revanche, le taux de survie des larves exposées en essai monospécifique était de l'ordre de 80 %, toute condition confondue, alors qu'en mésocosme il est dix fois plus faible, soit seulement de l'ordre de 8 % quelle que soit la condition (Figure 6). Les différences de résultats entre les deux expériences peuvent être expliquées de multiples façons : différence de configuration du système d'exposition, durée d'exposition prolongée en mésocosme, paramètre(s) physico-chimique(s) inadéquat(s) pour maintenir les chironomes dans de bonnes conditions en mésocosme, éventuel manque de nourriture pour garantir la survie des larves, etc.. Néanmoins, *C. riparius* est connu pour être ubiquiste et relativement résistant à différentes contaminations (Simiao-Ferreira *et al.*, 2009). Aussi, dans notre cas, la prédation par les pleurodèles semble être le principal critère responsable de la chute drastique du nombre de larves de *C. riparius*.

La croissance des chironomes, de même que leur retard de développement, ne semblent pas non plus affectés par le GO, dans la mesure où aucune différence significative n'est observée par rapport au témoin. En revanche, au vue de la durée d'exposition (15 jours en mésocosme), la croissance des chironomes parait très limitée, n'atteignant pas 9 mm, cette longueur étant pourtant un minimum requis chez les témoins au bout de 7 jours en essai normalisé (AFNOR, 2004). Parallèlement, un grand nombre de larves présente un retard de développement chez les témoins (40 %, contre 10 % chez les témoins en conditions monospécifiques). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette croissance et ce développement limités :

(i) En premier lieu, alors que le système est prévu pour être auto-suffisant, la quantité de nourriture nécessaire à la croissance des chironomes dans de bonnes conditions est peut-être sous-estimée. Des analyses quantitatives et qualitatives de la richesse du biofilm disponible pour les larves devraient permettre de répondre à cette question. Néanmoins, la surface des feuilles d'aulne, lesquelles constituent une ressource nutritive pour les larves, n'est consommée qu'entre 4 et 10 % seulement, toute condition confondue (Figure 5). L'accessibilité de ces feuilles, en termes de nutrition, n'est cependant pas garantie pour les larves dans leurs premiers stades de développement, puisque celles-ci se nourrissent essentiellement par filtration avant

de développer des pièces buccales suffisamment fortes et chitinisées pour être capables de brouter les feuilles.

(ii) De plus, les xénopes, même présents de manière très transitoire car rapidement consommés par les pleurodèles (ils ont été entièrement consommées au bout de deux jours), pourraient entrer en compétition avec les chironomes pour les ressources alimentaires. Ce sont en effet des filtreurs actifs de la colonne d'eau (Gradwell, 1975).

(iii) Par ailleurs, la faible croissance mesurée pourrait indirectement être liée au comportement nutritif des larves de chironome. Ces dernières remontent à la surface du sédiment pour déployer une sécrétion salivaire piégeant les particules en suspension afin de s'en nourrir ensuite. Ce faisant, les larves effectuent des mouvements rotatifs bien visibles à la surface du sédiment pour assurer une filtration efficace (Walshe, 1947). Ces mouvements n'échappent manifestement pas aux pleurodèles. Ainsi, les larves seraient d'autant plus susceptibles d'être prédatées qu'elles viennent se nourrir à la surface. Par conséquent, il ne resterait en fin d'exposition que les larves les moins efficaces dans leur comportement nutritif, et donc les plus petites, restant davantage cachées dans le sédiment.

Dans un cas comme dans l'autre, la faible croissance des larves résulterait d'un manque d'éléments nutritifs. Une éventuelle séquestration des nutriments par le GO (*via* l'adsorption), même possible (Cheng *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017), serait négligeable aux concentrations testées, puisqu'aucune différence de croissance ni de retard de développement n'est relevée par rapport au témoin. De plus, les chironomes sont des filtreurs non-sélectifs. Ils peuvent filtrer directement les particules de GO en suspension dans l'eau (par exemple, celles adsorbées à des biomolécules ou des sels), comme ils le font en condition d'exposition monospécifique (cf. Chapitre 6) ; ou bien, ils peuvent les ingérer *via* les diatomées qui les auraient piégées dans leurs substances exo-polymériques (EPS), comme elles le font avec le graphène multi-feuillet (Garacci *et al.*, 2017) et les nanotubes de carbone multi-parois (Verneuil *et al.*, 2014). Que les larves de chironome absorbent le GO d'une manière et/ou de l'autre n'induit manifestement pas d'effet sur leur croissance, aux faibles doses testées.

La présence de GO n'induit pas non plus de tératogénicité significative par rapport au témoin, qu'il s'agisse des fréquences de déformation ou de leur sévérité moyenne par individu (Figure 7). Ce résultat concorde là encore avec celui de l'essai monospécifique, pour lequel aucune tératogénicité significative n'avait été relevée à 0,1 $mg.L^{-1}$ (cf. Chapitre 6). Cependant, par

comparaison à cet essai monospécifique, les larves témoins du mésocosme présentent une fréquence de déformation et un indice de sévérité beaucoup plus élevés. Cela pourrait être dû à l'âge des larves en fin d'exposition, celles du mésocosme ayant séjourné deux fois plus longtemps avec le GO que celles de l'essai monospécifique. La tératogénicité a été évaluée par le même manipulateur dans le cadre des deux essais.

4.3. Effets du GO chez le prédateur : *Pleurodeles waltl*.

Les résultats montrent que la mortalité n'est pas impactée chez le pleurodèle en présence de GO pleurodèle ne voit pas sa mortalité impactée par le GO, pas plus que la croissance. L'absence d'effet du GO sur ces biomarqueurs avait déjà été constatée lors de l'exposition monospécifique des pleurodèles en conditions normalisées (ISO 21427-1, 2006) (cf. Chapitre 4). De plus, ces résultats attestent que l'écosystème recréé en mésocosme présente des conditions suffisantes pour répondre aux exigences des pleurodèles en termes de survie et de croissance, sur la durée de l'exposition.

D'autre part, une induction de génotoxicité est observée en présence de GO, et devient significative à 0,1 mg.L^{-1} (Figure 8), comme c'était le cas après exposition en essai monospécifique (cf. Chapitre 4). Néanmoins, les conditions d'exposition sont très différentes entre l'essai monospécifique et le mésocosme. Le comportement du GO dans un milieu aussi complexe s'avère difficile à évaluer compte tenu des verrous technologiques actuels, ne serait-ce que pour détecter et quantifier les nanoparticules (Doudrick *et al.*, 2015). Différents éléments comme les sels ou les biomolécules peuvent s'adsorber au GO (ou inversement) et jouer sur sa cinétique de sédimentation, ou au contraire favoriser son maintien en suspension (Zhao *et al.*, 2014). Le métabolisme des autres espèces en présence peut aussi contribuer à la modification de la biodisponibilité du GO pour le pleurodèle. Le biofilm (diatomées, bactéries, champignons) est notamment susceptible de capter les nanoparticules et de les retenir prisonnières (Garacci *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2011; Verneuil *et al.*, 2014), limitant leur accessibilité aux larves de pleurodèle par contact direct. Dans le même ordre d'idée, les chironomes et xénopes peuvent quant à eux participer à l'épuration de la colonne d'eau et concentrer le GO dans leurs fèces (Lagier *et al.*, 2017; Muzi *et al.*, 2016), voire dans leur organisme. En revanche, le GO pourrait être beaucoup plus accessible aux pleurodèles *via* l'ingestion des proies contaminées. D'après une étude menée chez *P. waltl*. en présence de nanoparticules de cérium, la bioaccumulation des nanoparticules au sein de l'organisme (mesurée après dépuration par prélèvement de leur intestin) serait essentiellement due à l'exposition alimentaire, plutôt qu'à la voie directe (Bour *et al.*, 2016b). De ce fait, chez le pleurodèle et dans nos conditions expérimentales, la voie

digestive serait une voie potentielle de génotoxicité, lorsque celle-ci est observée à 0,1 $mg.L^{-1}$. Néanmoins, la toxicité ne serait pas nécessairement corrélée à la bioaccumulation des nanoparticules (Bour *et al.*, 2016b; Buffet *et al.*, 2013; Jackson *et al.*, 2012). Quant aux mécanismes de génotoxicité impliqués, ils pourraient être similaires à ceux déjà décrits chez le xénope (cf. Chapitres 4 et 5) et reposer en partie sur une induction du stress oxydatif. A cela pourrait s'ajouter des effets liés aux capacités d'adsorption du GO, puisque l'affinité de ce dernier a été démontrée pour des polluants environnementaux divers, incluant des toxines algales (Pavagadhi *et al.*, 2013) ou des cations métalliques dont le GO peut augmenter la toxicité (Tang *et al.*, 2015).

Par ailleurs, lors de l'exposition au GO par voie directe en essai monospécifique, une induction significative de micronoyaux était relevée dès 0,05 $mg.L^{-1}$ (Chapitre 4). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le fait que les pleurodèles du mésocosme ne soient pas impactés à la plus faible dose testée :

(i) En mésocosme, 0,05 $mg.L^{-1}$ est la concentration nominale et finale atteinte en fin d'expérimentation. Les larves de pleurodèles sont donc exposées chaque jour à 1/15ème supplémentaire de la concentration finale en GO. Aussi, il se pourrait que les larves ne soient sensibles qu'à partir d'une dose seuil, qui manifestement n'est pas atteinte avant la fin de l'exposition, dans la condition à 0,05 $mg.L^{-1}$.

(ii) De plus, l'index mitotique chez les larves en fin d'exposition révèle une légère tendance à l'inhibition à 0,05 $mg.L^{-1}$, ce qui pourrait amenuiser les probabilités de formation des micronoyaux. Ajoutons que l'index mitotique relatif à chaque condition est particulièrement faible en fin d'exposition (< 1 ‰), ce qui pourrait être lié au stade avancé des larves, alors en métamorphose en fin d'exposition (car introduites après dépassement du stade 53 de la table de développement de Gallien & Durocher (1957), stade utilisé dans le cadre de l'essai monospécifique). De ce fait, les larves utilisées en mésocosme pourraient être moins sensibles.

5. Conclusion et perspectives

L'exposition au GO en mésocosme à 0,05 et à 0,1 $mg.L^{-1}$ aboutit à différentes réponses en fonctions des organismes. La réponse du biofilm en termes d'évolution des communautés bactériennes reste encore à acquérir à ce jour, et permettrait d'inférer bon nombres d'hypothèses. En particulier, cela pourrait permettre de comprendre ce qui limite la dégradation des feuilles à 0,1 $mg.L^{-1}$ de GO, alors que cette dégradation est significative à 0,05 $mg.L^{-1}$ par

rapport au témoin. Après deux semaines d'exposition, aucun effet significatif n'a été observé chez le chironome, par comparaison au groupe témoin. Les xénopes, introduits dans un but nutritif pour leurs prédateurs, ont tous été rapidement consommés. Les résultats se rapportant aux pleurodèles ont quant à eux montré une induction significative des micronoyaux à 0,1 $mg.L^{-1}$, soulignant le risque écotoxicologique que pourrait représenter le GO dans l'environnement, en particulier pour les derniers maillons de la chaîne trophique.

Les résultats des biomarqueurs ici étudiés représentent un bilan de toute la séquence d'évènements ayant pu se dérouler dans les mésocosmes pour aboutir au résultat final que nous observons, ce qui peut en complexifier l'interprétation. Ultérieurement, prévoir un système avec un prélèvement séquentiel des organismes pourrait éclairer la compréhension des mécanismes de fonctionnement et de toxicité en mésocosme. De plus, les interactions complexes entre les espèces du mésocosme gagneraient à être étudiées à une échelle expérimentale intermédiaire, confrontant par exemple des chironomes contaminés à des pleurodèles évoluant dans une eau non contaminée, afin d'évaluer l'effet du transfert trophique seul.

D'autre part, bien que les pleurodèles n'aient pas semblé manquer de nourriture, la faible croissance observée chez les larves de chironomes (y compris les témoins) soulève la question de l'autosuffisance des mésocosmes, en termes de nutrition. Le système ici présenté n'est décrit que pour la première fois, aussi quelques ajustements sont envisagés à l'avenir afin de pouvoir le valider. Par exemple, il pourrait être envisagé une complémentation en nourriture pour les chironomes, tout en veillant à maintenir l'équilibre du milieu. La vérification de l'état physiologique des organismes en fin d'expérimentation pourrait permettre de lever le doute sur ce problème.

Références bibliographiques

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Auffan, M., Tella, M., Santaella, C., Brousset, L., Paillès, C., Barakat, M., Espinasse, B., Artells, E., Issartel, J., Masion, A., Rose, J., Wiesner, M.R., Achouak, W., Alain, T., Bottero, J.-Y., 2014. An adaptable mesocosm platform for performing integrated assessments of nanomaterial risk in complex environmental systems. Sci. Rep. 4, 1‑7. doi:10.1038/srep05608

Bour, A., 2015. Effets écotoxicologiques de nanoparticules de dioxyde de cérium en milieu aquatique : d'une évaluation en conditions monospécifiques à l'étude de chaînes trophiques expérimentales en microcosme. Université de Toulouse.

Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., Christophe, P., Clivot, H., Gauthier, L., Pinelli, E., 2016a. Impact of CeO2 nanoparticles on the functions of freshwater ecosystems: a microcosm study. Environ. Sci. Nano 3, 830‑838. doi:10.1039/C6EN00116E

Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Verneuil, L., Baqué, D., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., Pagnout, C., Clivot, H., Fourquaux, I., Tella, M., Auffan, M., Laury, G., Pinelli, E., 2016b. Toxicity of CeO2 nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: a study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. Nanotoxicology 10, 245‑255. doi:10.3109/17435390.2015.1053422

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review. J. Hazard. Mater. 283, 764‑777. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.021

Buffet, P.-E., Pan, J.-F., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2013. Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve Scrobicularia plana to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. Ecotoxicol. Environ. Saf. 89, 117‑124. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.019

Cheng, C., Li, S., Thomas, A., Kotov, N.A., Haag, R., 2017. Functional graphene nanomaterials based architectures: biointeractions, fabrications, and emerging biological applications. Chem. Rev. 117, 1826‑1914. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00520

Cui, Y., Kim, S.N., Naik, R.R., McAlpine, M.C., 2012. Biomimetic peptide nanosensors. Acc. Chem. Res. 45, 696‑704. doi:10.1021/ar2002057

Djomo, J.E., Ferrier, V., Békaert, C., 2000. Amphibian micronucleus test in vivo (Jaylet test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65, 168‑174. doi:10.1007/s001280000111

Doudrick, K., Nosaka, T., Herckes, P., Westerhoff, P., 2015. Quantification of graphene and graphene oxide in complex organic matrices. Environ. Sci. Nano 2, 60‑67. doi:10.1039/c4en00134f

Ema, M., Gamo, M., Honda, K., 2017. A review of toxicity studies on graphene-based nanomaterials in laboratory animals. Regul. Toxicol. Pharmacol. 85, 7‑24. doi:10.1016/j.yrtph.2017.01.011

Fernandez, M., L'Haridon, J., Gauthier, L., Zoll-Moreux, C., 1993. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. Mutat. Res. 292, 83‑99.

Ferry, J.L., Craig, P., Hexel, C., Sisco, P., Frey, R., Pennington, P.L., Fulton, M.H., Scott, I.G., Decho, A.W., Kashiwada, S., Murphy, C.J., Shaw, T.J., 2009. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. Nat. Nanotechnol. 4, 441‑444. doi:10.1038/NNANO.2009.157

Gallien, L., Durocher, M., 1957. Table chronologique du developpement chez Pleurodeles waltll Michah. Bull. Biol. Fr. Belgique 91, 97‑114.

Garacci, M., Barret, M., Mouchet, F., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Flahaut, E., Gauthier, L., Silvestre, J., Pinelli, E., 2017. Few layer graphene sticking by biofilm of freshwater diatom Nitzschia palea as a mitigation to its ecotoxicity. Carbon N. Y. 113, 139‑150. doi:10.1016/j.carbon.2016.11.033

Gauthier, L., Mouchet, F., 2017. Genotoxicity in urodele amphibians Pleurodeles waltl and Ambystoma mexicanum (Lissamphibia, Caudata) exposed to freshwater pollutants: a historical view, in: Larramendy, M.L. (Éd.), Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional aquatic models. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 347‑370. doi:10.1039/9781782629887-00347

Gottschalk, F., Nowack, B., 2011. The release of engineered nanomaterials to the environment. J. Environ. Monit. 13, 1145‑1155. doi:10.1039/c0em00547a

Graça, M.A.S., Ferreira, R.C.F., Coimbra, C.N., 2001. Litter processing along a stream gradient: the role of invertebrates and decomposers. J. North Am. Benthol. Soc. 20, 408‑420. doi:10.2307/1468038

Gradwell, N., 1975. The Bearing of Filter Feeding on the Water Pumping Mechanism of Xenopus Tadpoles (Anura : Pipidae). Acta Zool. 56, 119‑128.

Guo, Z., Xie, C., Zhang, P., Zhang, J., Wang, G., He, X., Ma, Y., Zhao, B., Zhang, Z., 2017. Toxicity and transformation of graphene oxide and reduced graphene oxide in bacteria biofilm. Sci. Total Environ. 580, 1300‑1308. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.12.093

ISO 21427-1, 2006. Water Quality-Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei-Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae; International Organization for Standardization. Geneva.

Jackson, B.P., Bugge, D., Ranville, J.F., Chen, C.Y., 2012. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod Leptocheirus plumulosus. Environ. Sci. Technol. 46, 5550‑5556. doi:10.1021/es202864r

Kulacki, K.J., Cardinale, B.J., Keller, A.A., Bier, R., Dickson, H., 2012. How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores. Environ. Toxicol. 31, 1‑9. doi:10.1002/etc.1962

Lagier, L., Mouchet, F., Laplanche, C., Mottier, A., Cadarsi, S., Evariste, L., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2017. Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians. Carbon N. Y. 119, 72‑81. doi:10.1016/j.carbon.2017.04.016

Liu, S., Zeng, T.H., Hofmann, M., Burcombe, E., Wei, J., Jiang, R., Kong, J., Chen, Y., 2011. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. ACS Nano 5, 6971‑6980. doi:10.1021/nn202451x

Loh, K.P., Bao, Q., Eda, G., Chhowalla, M., 2010. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. Nat. Chem. 2, 1015‑1024. doi:10.1038/nchem.907

Martins, R.T., da Silveira, L.S., Lopes, M.P., Alves, R.G., 2017. Invertebrates, fungal biomass, and leaf breakdown in pools and riffles of neotropical streams. J. Insect Sci. 17, 1‑11. doi:10.1093/jisesa/iew113

Muzi, L., Mouchet, F., Cadarsi, S., Janowska, I., Russier, J., Ménard-Moyon, C., Risuleo, G., Soula, B., Galibert, A.-M., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., Bianco, A., 2016.

Examining the impact of multi-layer graphene using cellular and amphibian models. 2D Mater. 3, 1‑10. doi:10.1088/2053-1583/3/2/025009

Novoselov, K.S., Fal'ko, V.I., Colombo, L., Gellert, P.R., Schwab, M.G., Kim, K., 2012. A roadmap for graphene. Nature 490, 192‑200. doi:10.1038/nature11458

Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., Sun, T., Shao, L., 2016. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. Part. Fibre Toxicol. 13, 1‑24. doi:10.1186/s12989-016-0168-y

Paredes, J.I., Villar-Rodil, S., Martinez-Alonso, A., Tascon, J.M.D., 2008. Graphene oxide dispersions in organic solvents graphene oxide dispersions in organic solvents. Langmuir 24, 10560‑10564. doi:10.1021/la801744a

Pascoal, C., Cassio, F., 2004. Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5266‑5273. doi:10.1128/AEM.70.9.5266

Pascoal, C., Cássio, F., Marcotegui, A., Sanz, B., Gomes, P., 2005. Role of fungi, bacteria, and invertebrates in leaf litter breakdown in a polluted river. J. North Am. Benthol. Soc. 24, 784‑797. doi:10.1899/05-010.1

Pavagadhi, S., Lena, T.A.L., Sathishkumar, M., Ping, L.K., Balasubramanian, R., 2013. Removal of microcystin-LR and microcystin-RR by graphene oxide: adsorption and kinetic experiments. Water Res. 47, 4621‑4629. doi:10.1016/j.watres.2013.04.033

Peralta-Videa, J.R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hong, J., Gardea-Torresdey, J.L., 2011. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010. J. Hazard. Mater. 186, 1‑15. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.020

Robert, J.-M., Maestrini, S.Y., 1986. Absorptions simultanées des ions N03- et NH4+ par trois diatomées de claires à huitres, en culture axénique. Phycologia 25, 152‑159. doi:10.2216/i0031-8884-25-2-152.1

Ruiz, O.N., Fernando, K.A.S., Wang, B., Brown, N.A., Luo, P.G., McNamara, N.D., Vangsness, M., Sun, Y.-P., Bunker, C.E., 2011. Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth. ACS Nano 5, 8100‑8107. doi:10.1021/nn202699t

Simiao-Ferreira, J., DeMarco, P.J., Mazao, G.R., Carvalho, A.R., 2009. Chironomidae assemblage structure in relation to organic enrichment of an aquatic environment. Neotrop. Entomol. 38, 464‑471. doi:10.1590/S1519-566X2009000400004

Tang, Y., Tian, J., Li, S., Xue, C., Xue, Z., Yin, D., Yu, S., 2015. Combined effects of graphene oxide and Cd on the photosynthetic capacity and survival of Microcystis aeruginosa. Sci. Total Environ. 532, 154‑161. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.081

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.-C., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea: « A sticky story ». Nanotoxicology 5390, 1‑11. doi:10.3109/17435390.2014.918202

Walshe, B.M., 1947. Feeding mechanisms of Chironomus larvae. Nature 160, 474.

Zhao, J., Cao, X., Wang, Z., Dai, Y., Xing, B., 2017. Mechanistic understanding toward the toxicity of graphene-family materials to freshwater algae. Water Res. 111, 18‑27. doi:10.1016/j.watres.2016.12.037

Zhao, J., Wang, Z., White, J.C., Xing, B., 2014. Graphene in the aquatic environment:

adsorption, dispersion, toxicity and transformation. Environ. Sci. Technol. 48, 9995‑10009. doi:10.1021/es5022679

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le contexte d'une évaluation du risque environnemental posé par les nanoparticules, et plus précisément, dans le cadre d'une démarche prospective menée en laboratoire visant à évaluer l'écotoxicité des nanoparticules de carbone (NPC) en milieu aquatique.

Cette démarche a été abordée selon trois grands axes. Suite au rejet potentiels des NPC dans la colonne d'eau tout au long de leur cycle de vie, nous sommes partis du principe que les organismes pélagiques (en premier lieu) pouvaient être exposés à des NPC de caractéristiques variables en termes de forme, taille, nombre de parois/feuillets, surface spécifique, pureté, ou composition chimique. Ces NPC, selon leurs caractéristiques, mais aussi selon les paramètres physico-chimiques du milieu, incluant la présence de dispersants chimiques, sont amenés à interagir avec les organismes vivants. Nos travaux ont permis de mettre en évidence un paramètre unique permettant de décrire et de prédire l'effet des NPC testés sur la croissance de l'amphibien *Xenopus laevis*.

Néanmoins, la toxicité des NPC sur la croissance ne s'exprimant qu'à forte dose, nous avons examiné un autre biomarqueur chez cet organisme -la génotoxicité- pouvant être plus sensible aux faibles doses, c'est-à-dire à des concentrations plus pertinentes sur le plan environnemental. L'étude de cette génotoxicité à faible dose et de ses mécanismes nous a amenés à nous focaliser sur l'oxyde de graphène (le GO, et son équivalent réduit). Une analyse de l'expression des gènes est venue compléter l'étude de l'induction des micronoyaux afin de dévoiler certains mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité du GO.

En troisième intention, nous avons souhaité élargir notre étude d'écotoxicité du GO à d'autres espèces, avec pour objectif ultime de reconstituer une chaîne trophique expérimentale en mésocosme (producteurs primaires, consommateurs primaires, prédateurs). La prise en compte de l'écotoxicité d'un contaminant à l'échelle d'un écosystème est certes plus réaliste vis-à-vis des conditions naturelles, mais souffre d'une certaine complexité d'interprétation. Aussi, les espèces ont d'abord été exposées individuellement. Afin d'étudier l'écotoxicité du GO au niveau du sédiment, le choix de l'espèce benthique s'est porté sur *Chironomus riparius*, espèce ubiquiste, fournissant une biomasse abondante à l'état larvaire et entrant dans la composition de bon nombre de chaînes trophiques naturelles.

1. Comparaison de l’impact de différentes nanoparticules nanocarbonées sur la croissance de *Xenopus laevis* : un effet prédit par la surface spécifique.

Les effets de différents allotropes de carbone ont été évalués sur la croissance de *Xenopus laevis* avec la même méthodologie, par exposition semi-statique de 12 jours en conditions normalisées (ISO 21427-1, 2006). En premier lieu, nos essais se sont orientés vers quatre NPC brutes, ou « nues », sans autre moyen de dispersion dans la colonne d’eau que la dispersion mécanique par ultrason, réalisée préalablement à chaque contamination. A forte dose, ces NPC (des nanotubes de carbone double et multi-paroi, DWCNT et MWCNT, des nanodiamants, ND, et du graphène multi-feuillet, FLG-ball) ont induit une inhibition de croissance chez les larves de xénope, excepté le FLG-ball. Sur la base de leur concentration massique, classer ces NPC par ordre de toxicité croissant s’avère possible : FLG-ball < ND < MWCNT < DWCNT.

Cela étant, difficile alors de distinguer les mécanismes de toxicité impliqués par ces différents allotropes, et de prédire les effets de ces derniers, puisque l’ensemble de leurs caractéristiques physico-chimiques varie de l’un à l’autre. Certaines études font ressortir des critères bien précis, propres à l’échelle nanométrique, qui sembleraient prédominer sur les autres lors de l’induction des effets biologiques. La surface, comparée au nombre total d’atomes, augmente de manière exponentielle lorsque la taille de la particule diminue (Auffan *et al.*, 2009). Avec une surface de réactivité augmentée, une nanoparticule devrait donc rendre possible un effet biologique plus grand, par unité de masse, que des particules de taille plus importante (Oberdörster *et al.*, 2005). Ainsi, nous avons cherché à exprimer l’évolution du taux de croissance en fonction non seulement de la concentration massique ($mg.L^{-1}$), mais aussi surfacique ($m^2.L^{-1}$) des nanoparticules, ainsi qu’en fonction de leur nombre. A travers la comparaison des modèles mathématiques correspondant à chacune de ces unités, la surface est apparue comme meilleur paramètre descripteur de l’inhibition de croissance, loin devant la masse et le nombre de particules (Chapitre 3). Cette approche remet donc en question la pertinence de l’unité traditionnellement utilisée pour définir la toxicité d’un contaminant -la masse- lorsque le contaminant en question est un nano-objet. Ainsi, il ressort que l’inhibition de croissance dépendrait principalement de la surface des NPC et serait indépendante de leur forme allotropique, toutes les NPC conduisant, à surface équivalente, au même niveau de toxicité.

Par ailleurs, les nanoparticules de carbone sont finalement assez peu susceptibles de se retrouver sous forme « nue » dans l’environnement. Dès leur synthèse, elles peuvent être fonctionnalisées (oxydées par exemple) de manière covalente afin d’adapter leurs propriétés à des utilisations bien précises (Georgakilas *et al.*, 2012, 2008). Ou encore, dans les écosystèmes aquatiques,

elles peuvent s'associer avec des biomolécules formant des « corona » autour d'elles et leur garantissant ainsi une fonctionnalisation non-covalente (Grillo *et al.*, 2015; Monopoli *et al.*, 2012; Yang et Xing, 2009). La fonctionnalisation des NPC a généralement pour conséquence d'augmenter leur hydrophilicité et leur dispersion en milieu aqueux, tandis que les NPC brutes ont tendance à sédimenter plus rapidement (B. Saleh *et al.*, 2010; Grillo *et al.*, 2015; Hilding *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009). Avec une chimie de surface modifiée, les nanoparticules carbonées sont susceptibles d'offrir non seulement une exposition (et donc une biodisponibilité) différente pour les organismes dulçaquicoles, mais elles peuvent aussi présenter une toxicité différente de celle induite par leur équivalent brut (Guo et Mei, 2014). Le xénope, en tant qu'organisme pélagique, pourrait être sensible à la dispersion des particules. Nous avons cherché à savoir si la croissance des larves de *X. laevis* était impactée différemment selon l'état de dispersion/fonctionnalisation des nanoparticules. Autrement dit, nous avons cherché à savoir si des NPC ainsi dispersées pouvaient prétendre à la même conclusion que les NPC brutes précédemment testées, à savoir une inhibition de croissance régie par la surface des particules. Aussi, en respectant la même méthodologie que précédemment (ISO 21427-1, 2006), les xénopes ont été exposés à cinq nouvelles NPC (dispersées par sonication comme précédemment, en plus de l'être par fonctionnalisation) : des MWCNT en présence de carboxyméthylcellulose (molécule d'origine synthétique, mais capable de disperser les nanoparticules et de mimer ainsi le rôle de composés biologiques ; MW-CMC), des DWCNT en présence de matière organique naturelle en provenance de la rivière Suwannee (DW-SRNOM), des DWCNT oxydés (DW-ox), et deux lots d'oxyde de graphène (GO). La comparaison de l'expression de la croissance en fonction de la concentration massique et surfacique des particules a été renouvelée, à l'aide des mêmes modèles mathématiques (Chapitre 3). De nouveau, il ressort que la surface est le meilleur paramètre descripteur de l'inhibition de croissance, et qu'à surface métrique équivalente, la toxicité induite est la même, quelle que soit la nature chimique de la surface. Ce résultat, selon lequel la chimie de surface pourrait être négligée vis-à-vis de la toxicité observée, contraste avec la littérature, qui décrit généralement des effets plus (Cheng *et al.*, 2009; J. Edgington *et al.*, 2010; J. Petersen *et al.*, 2011) ou moins toxiques (Li *et al.*, 2008) des NPC fonctionnalisés par rapport à leur équivalent brut, chez les organismes aquatiques.

Toutefois, cette conclusion demande à être confrontée à d'autres modèles biologiques et à d'autres biomarqueurs avant de pouvoir être extrapolée. Chez le xénope, les mécanismes régissant l'inhibition de croissance par l'intermédiaire de la surface spécifique des NPC peuvent

être de plusieurs ordres. La croissance étant un paramètre intégrateur de mécanismes directs et indirects de toxicité, elle peut être potentiellement impactée *via* différentes voies, incluant la peau, les branchies, ou encore le tractus digestif des larves. Chacun de ces organes est caractérisé par une surface d'échange importante, qui, si elle venait à être confrontée à une surface de particules donnée, pourrait aboutir à une inhibition de croissance. La peau, très fine, assurant la plus grande part de la respiration à l'état larvaire (Burggren *et al.*, 1983), pourrait être recouverte d'une fine couche de NPC limitant les échanges gazeux. Les branchies, dont la fonction respiratoire n'est pas négligeable, pourraient également voir leur fonctionnement normal entravé par des accumulations de NPC (visibles d'après nos observations). L'effet supposé des NPC sur les organes respiratoires aquatiques pourrait alors contraindre les larves à davantage utiliser leurs poumons. Nécessitant des remontées à la surface, cette respiration aérienne pourrait représenter un coup énergétique supplémentaire, et de ce fait réduire l'énergie allouée à la croissance. Néanmoins, les larves de xénope, en tant qu'organismes pélagiques, seraient davantage au contact des NPC les plus stables dans la colonne d'eau, *via* leurs branchies et leur peau. Alors qu'une toxicité plus élevée serait attendue de la part des NPC fonctionnalisées (dont le contact avec les branchies et la peau est prolongé par rapport au NPC brutes), ce n'est pourtant pas ce que révèlent nos résultats. Ces voies ne semblent donc pas prédominantes pour expliquer l'inhibition de croissance telle que nous l'observons : inhibition indépendante du type de NPC. Reste la voie digestive. A ce stade, il convient de remarquer que les larves utilisées sont des organismes à la fois filtreurs et brouteurs (Seale *et al.*, 1982), capables d'absorber les NPC dispersées dans la colonne d'eau comme celles ayant sédimenté. Cela revient à négliger l'état de dispersion des NPC pour ce qui est de leur ingestion. D'ailleurs, nos observations du tube digestif des larves confirment que les NPC s'agglomèrent dans l'intestin indépendamment de leur état de dispersion dans la colonne d'eau. L'ingestion s'annoncerait donc comme la voie privilégiée pour expliquer l'inhibition de croissance. Les mécanismes de toxicité impliqués pourraient dans ce cas reposer sur l'interaction des NPC avec les nutriments. Plus précisément, la présence de NPC dans le tractus digestif pourrait conduire à la séquestration d'éléments nutritifs essentiels comme des acides aminés, des vitamines (Guo *et al.*, 2008), mais aussi des acides nucléiques et d'autres molécules hydrophobes (Sanchez *et al.*, 2012). Il a par ailleurs été démontré que la capacité d'adsorption des NPC augmentait avec la surface spécifique (Boncel *et al.*, 2015). Enfin, les NPC sont connues pour induire du stress oxydatif à travers la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont le colmatage des branchies (Saria *et al.*, 2014) ou la privation prolongée de nourriture (E. Morales *et al.*, 2004) peuvent -entre autres- être à l'origine. D'après certains auteurs, des nanoparticules de surface

spécifique élevée mèneraient à une plus grande production de ROS que leur équivalent de taille plus grossière (P. Fu *et al.*, 2014). Au sein des organismes, l'induction de systèmes de défense contre le stress oxydatif peut mettre en jeu des ressources énergétiques qui ne seraient alors plus disponibles pour la croissance. Nombre d'hypothèses sont donc basées sur le déficit énergétique pour expliquer l'inhibition de croissance. La vérification de ces hypothèses pourrait être envisagée par un dosage des réserves énergétiques des animaux, notamment de leur teneur en sucres, protéines et lipides.

Pour en revenir au modèle mathématique décrivant la croissance, il s'agit au final d'un outil intéressant pour prédire à quelle concentration ($m^2.g^{-1}$) une NPC donnée entrainera de la toxicité. Par le biais du modèle, la concentration pour laquelle 50 % d'inhibition de croissance a été observée (CE_{50}) a été estimée à 9,85 $m^2.L^{-1}$. Pour donner une correspondance avec une CE_{50} basée sur la concentration massique, cela correspondrait à une valeur allant de 10 $mg.L^{-1}$ pour les DWCNT (dont la surface spécifique est élevée) à 985 $mg.L^{-1}$ pour le FLG-ball (dont la surface spécifique est faible). La prédiction de ces concentrations efficaces est rendue possible dès lors que la surface spécifique de la particule est connue. Cela nécessite une technique identique pour estimer cette surface (dans notre cas, l'adsorption d'azote), puisque l'emploi de méthodes différentes pourrait introduire un biais et aboutir à une surface spécifique différente. Par exemple, un graphène multi-feuillet (FLG-pencil) dont la surface spécifique a été mesurée par adsorption de bleu de méthylène n'entre pas parfaitement dans notre modèle. En effet, le colorant permet de calculer la surface totale des NPC, en s'insérant entre les feuillets, alors que l'azote permet de calculer la surface externe des NPC. Enfin, plusieurs perspectives sont envisageables afin d'élargir cette possibilité de prédire la toxicité d'une particule d'après sa surface. Le modèle pourrait bien-sûr être étudié avec d'autres nanoparticules pour voir s'il y est applicable. La question de la solubilité des nanoparticules pourrait éventuellement représenter une limite, comme pour certaines nanoparticules métalliques. D'autre part, nous avons rencontré un cas de particule, pourtant considérée comme une NPC, qui n'obéissait pas au modèle : le noir de carbone, qui, en formant des structures arborescentes par agrégation sur lui-même, sortait du cadre de l'échelle nanométrique. Ceci souligne le fait que certaines spécificités pourraient nuancer la toxicité des particules et la rendre imprédictible. De plus, d'autres organismes que le xénope pourraient être utilisés afin d'étendre notre conclusion.

Enfin, d'autres biomarqueurs que la croissance méritent d'être investis avant de prétendre à un paramètre unique gouvernant « La » toxicité en général. Il parait aujourd'hui évident que toute

la toxicité due aux NPC ne se résume pas à leur seule surface spécifique, aussi importante soit-elle. Par exemple, nous avons renouvelé la même approche sur le critère de génotoxicité chez le xénope, exposé dans les mêmes conditions à différents allotropes de carbone. Nos observations mettent clairement en évidence que dans ce cas-là, la surface des particules n'est pas plus pertinente que leur masse pour expliquer les résultats obtenus (cf. Annexe 3). D'autres mécanismes, plus complexes, entrent manifestement en jeu.

2. Effet de l'oxyde de graphène chez *Xenopus laevis* à faible dose : génotoxicité et mécanismes moléculaires impliqués.

Parallèlement à l'étude de la croissance des xénopes exposés à différents allotropes de carbone, les mêmes organismes ont été utilisés pour étudier la génotoxicité (induction de micronoyaux) des NPC. Ce biomarqueur rend compte d'effets biologiques considérés comme parmi les plus sérieux qui soient. Les micronoyaux constituent des aberrations chromosomiques irréversibles pour les cellules, et peuvent avoir des conséquences au niveau de l'organisme (risque de cancer) ou de sa descendance (reprotoxicité). Aussi, l'étude la génotoxicité des NPC représente une étape cruciale dans l'évaluation et la gestion des risques environnementaux et sanitaires.

Dans ce cadre, nos résultats n'ont révélé aucune génotoxicité significative chez les xénopes exposés à des NPC brutes, qu'il s'agisse de DWCNT, de MWCNT (trois lot testés), de ND, du noir de carbone ou encore des FLG-ball et FLG-pencil. Bien que certains essais mettent en évidence un impact des NPC brutes sur l'ADN des organismes ou cellules exposés (Fernandes *et al.*, 2017; Sasidharan *et al.*, 2016), il semblerait qu'*in vivo*, chez le xénope, des barrières biologiques ou d'éventuels mécanismes de défense ou de réparation viennent contrer ces effets.

Par contre, une induction de génotoxicité, souvent significative, s'est manifestée chez les xénopes exposés à des NPC fonctionnalisées (par covalence ou pas) : MWCNT fonctionnalisés avec du triéthylène glycol-amine (MW-TEG-amine), MW-CMC, DW-SRNOM, DW-ox, et GO (trois lots testés). Dans la littérature, la fonctionnalisation des particules est rapportée pour tantôt accentuer la génotoxicité, tantôt pour la diminuer, selon les conditions d'exposition et les organismes étudiés (Ema *et al.*, 2017, 2016; Sanchez *et al.*, 2012). Dans notre cas, le point commun à toutes les NPC testées est une dispersion relativement stable dans la colonne d'eau -via leur fonctionnalisation, aussi diverse soit-elle. L'explication de l'induction d'aberrations chromosomiques dans les érythrocytes résiderait, en partie, dans cette dispersion, laquelle conditionne l'exposition des organismes, comme nous l'avons précédemment décrit. Les effets

génotoxiques observés ont lieu à des concentrations diverses selon les NPC : parfois à la plus forte concentration testée (DW-SRNOM), parfois à une concentration intermédiaire dans la gamme testée (MW-TEG-amine, MW-CMC, DW-ox). Ces différences pourraient fortement dépendre des caractéristiques propres aux NPC et à leurs fonctions. En particulier, leur cinétique d'agrégation pourrait conditionner la biodisponibilité au niveau cellulaire et leur toxicité (Vale *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2014).

Parmi ces NPC fonctionnalisées, l'une d'elles a attiré notre attention puisqu'elle est la seule à se montrer génotoxique à la plus faible dose testée (0,1 $mg.L^{-1}$) : le GO. Même si la concentration environnementale en nanoparticules de carbone manufacturées n'est pas connue à ce jour, et sauf déversement accidentel impliquant de fortes concentrations localement, il est plus probable de retrouver de faibles doses dans la nature. Aussi, le GO représenterait dans ce cas un risque environnemental relativement important qu'il convient de mieux cerner. Ajoutons que lors de la synthèse du graphène, le GO est produit à l'échelle industrielle pour servir de précurseur, du fait de sa capacité de dispersion qui le rend plus facilement manipulable. Face à cette production, les émissions de GO dans l'environnement pourraient être plus importantes que celles des autres GFM.

De ce fait, nous avons recherché les causes de la génotoxicité observée. A l'échelle moléculaire, le GO peut agir comme un intercalant à l'ADN (Liu *et al.*, 2013; Seabra *et al.*, 2014) et aboutir à des déformations ou des cassures à l'origine de son effet mutagène (Zhao, 2011). Chez le xénope, la surface spécifique entrerait-elle de nouveau en jeu dans l'induction de la (géno)toxicité ? Manifestement, cela ne semble plus être le cas ici, puisque les DWCNT, dont la surface spécifique est plus grande que celle du GO, n'induisent pas de génotoxicité significative quelle que soit leur concentration. Qu'en est-il de la pureté des échantillons de GO ? Plusieurs études mettent en garde quant à l'interprétation de résultats de toxicité faussement positifs, qui seraient issus des impuretés plutôt que des NPC elles-mêmes (Petersen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; Yang et Xing, 2007). Lors de sa synthèse, le GO pourrait être contaminé par des éléments métalliques (fer, cobalt, nickel, manganèse) et/ou des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), dont le potentiel génotoxique est avéré (Abdel-Shafy et Mansour, 2016; Wislocki *et al.*, 1976). Le dosage de ces impuretés a confirmé leur présence dans le GO, mais leurs quantités étaient si faibles qu'elles n'ont pas atteint des seuils de toxicité significatifs, et ce même à la plus forte dose de GO testée (10 $mg.L^{-1}$) (Klein et Costa, 2014; Lucchini *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). Ces impuretés ont donc été jugées négligeables vis-à-vis de la génotoxicité observée. Notre recherche s'est alors orientée vers le

degré d'oxydation du GO. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs rapporté que des NPC oxydés présentaient de plus grands risques de toxicité que leur équivalent brut (Bianco, 2013; Sanchez *et al.*, 2012). Comparé aux graphènes multi-feuillet bruts (FLG-ball, FLG-pencil), le GO est beaucoup plus oxydé, ce qui pourrait être à l'origine de son effet. Cependant, une comparaison rigoureuse du GO avec les FLG est quelque peu illégitime, dans la mesure où il s'agit de deux produits différents : le GO n'est pas fabriqué à partir des FLG, ni inversement, et le degré d'oxydation n'est pas le seul paramètre variant entre les deux types de matériaux. Donc, pour savoir si l'oxydation est bien responsable de la génotoxicité, notre démarche a consisté à modifier la chimie de surface du GO de sorte à abaisser son degré d'oxydation, en changeant le moins possible ses autres caractéristiques physico-chimiques. Les deux nouvelles particules ainsi obtenues (par réduction thermique sous atmosphère hydrogénée), le graphène réduit à 200 (rGO200) ou à 1000°C (rGO1000), ont alors été utilisées pour exposer les xénopes à un gradient d'oxydation (Chapitre 4). Nos résultats ont clairement montré une disparition de la génotoxicité dès la réduction à 200°C, faisant du rGO une NPC plus sûre que l'oxyde de graphène.

L'oxydation du GO apparaissant responsable de l'induction des micronoyaux chez le xénope dans nos conditions expérimentales, nous avons souhaité approfondir notre étude en nous intéressant aux mécanismes de toxicité impliqués. En premier lieu, il a été montré que le GO était plus stable en suspension que le rGO1000 (le rGO200 présentant une stabilité intermédiaire), offrant une possibilité d'interaction prolongée avec les larves dans la colonne d'eau, et donc potentiellement plus de toxicité. Par ailleurs, la nature des fonctions oxygénées du GO a révélé la présence d'éthers, d'hydroxyles, et d'époxydes. Dès la réduction à 200°C, ces fonctions disparaissent au profit des quinones, tandis que seules des semiquinones persistent suite au traitement à 1000°C. Les fonctions du GO seraient donc grandement impliquées dans son potentiel génotoxique, en particulier les époxydes, bien connus pour provoquer du stress oxydatif (Fuccelli *et al.*, 2014) et des adduits à l'ADN (Leuratti *et al.*, 1994; Luczaj et Skrzydlewska, 2003; Marnett, 2000). Ainsi, l'induction des micronoyaux pourrait résulter de phénomènes directs (impact du GO sur l'ADN) ou indirects (impact du GO médié par les ROS). Un impact direct du GO impliquerait son entrée dans les cellules, ce qui à ce jour n'a pas été démontré chez l'amphibien *in vivo*. L'induction de stress oxydatif par le GO a par contre été rapportée par de nombreuses études (Chen *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013; P. Fu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016), bien qu'elle ne soit pas nécessairement associée à la formation de micronoyaux (Saria *et al.*, 2014).

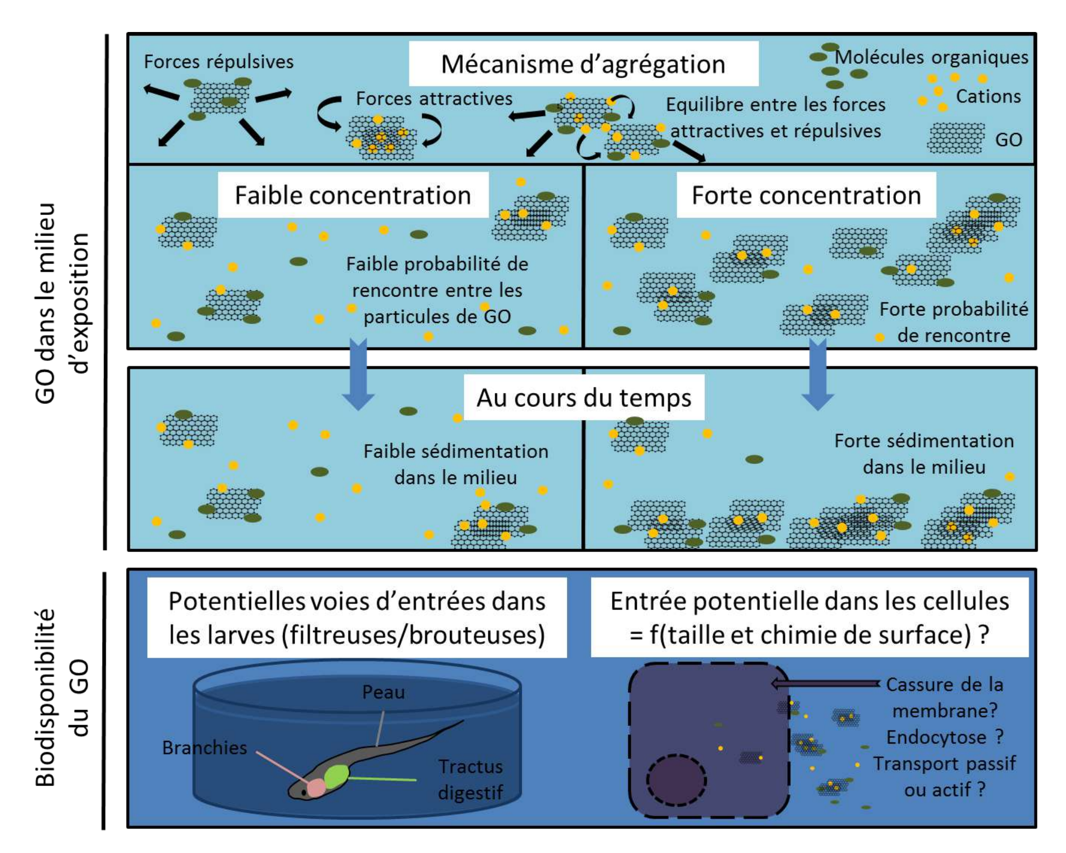


Figure 1. Représentation schématique de la cinétique d'agrégation et de sédimentation de l'oxyde de graphène dans la colonne d'eau et de sa potentielle biodisponibilité pour les organismes et les cellules.

Par ailleurs, l'induction des micronoyaux ne s'est manifestée qu'à la plus faible dose testée. S'interrogeant sur les phénomènes se produisant à cette concentration, nous avons observé la stabilité du GO dans la colonne d'eau à dose croissante. Il s'est avéré que la plus forte dose est celle qui sédimentait le plus rapidement, alors que la plus faible était la plus stable dans la colonne d'eau. La concentration la plus faible correspond donc à celle pour laquelle les larves étaient le plus longtemps en contact avec les particules de GO dans la colonne d'eau. De plus, l'état d'agrégation des nanoparticules, qui pourrait également conditionner leur biodisponibilité (Ou *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2014), est supposé varier en fonction de la concentration. Comme représenté schématiquement par la Figure 1, l'action conjointe entre les forces électrostatiques attractives et répulsives peut mener à une faible probabilité de rencontre entre les particules de GO à faible dose. Au contraire, la concentration augmentant, la probabilité de rencontre entre les particules croitrait de même, expliquant le fait que leur sédimentation soit plus rapide. Des particules non agrégées entre elles seraient ainsi davantage biodisponibles pour l'organisme, *via* différentes voies d'entrée (la peau et les branchies sont particulièrement suspectées). Au niveau cellulaire, différents mécanismes d'internalisation seraient également plus susceptibles de se produire avec des particules « libres ». Effectivement, l'agrégation des NPC forme un ensemble de taille plus grande qu'une nanoparticule isolée, ce qui limiterait les transferts

potentiels *via* la membrane cellulaire et ainsi, l'atteinte aux fonctions vitales de la cellule (Ou *et al.*, 2016).

En outre, un autre argument expliquant l'absence de génotoxicité à forte dose tient dans l'origine même de la formation des micronoyaux. Ceux-ci ne peuvent apparaitre que lors d'une division cellulaire. Nos résultats relatifs au nombre de mitoses érythrocytaires montrent une inhibition significative à 10 mg.L^{-1}, ce qui implique une diminution de la probabilité d'apparition des micronoyaux à cette concentration. En revanche, ces travaux de cette thèse ne permettent pas d'expliquer cette inhibition de mitoses, si ce n'est, peut-être, par un lien avec l'inhibition de croissance. Selon cette hypothèse, les phénomènes régissant le taux de mitoses érythrocytaires et l'inhibition de croissance seraient de même ordre : un organisme souffrant d'un manque de ressources énergétiques privilégierait davantage sa survie et ses systèmes de défense plutôt que son développement, sa croissance et ses divisions cellulaires (Bradley *et al.*, 1991; Daignan-fornier et Sagot, 2011; Seidel et Kimble, 2015).

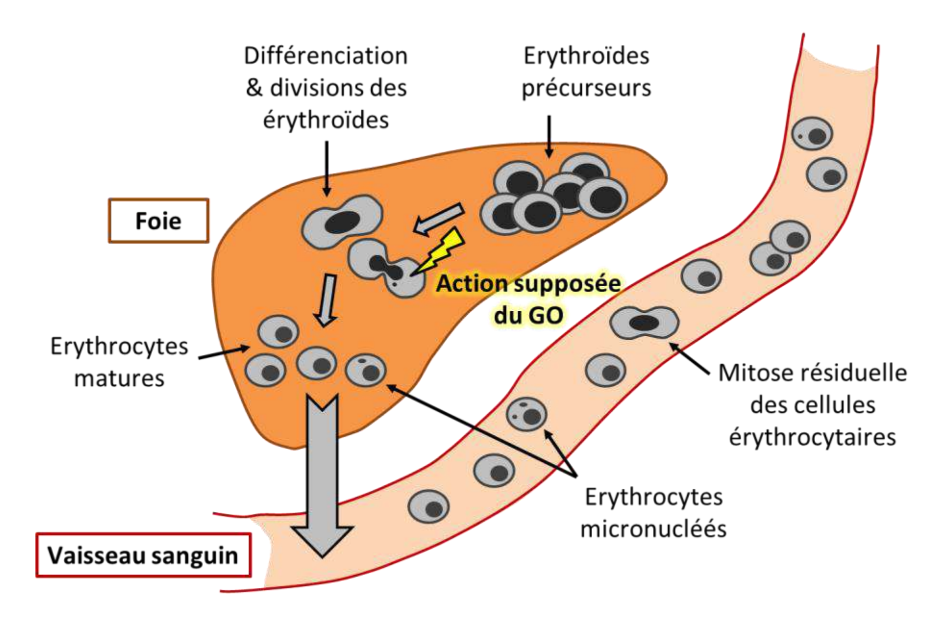


Figure 2. Représentation schématique de la voie d'action supposée du GO (de manière directe ou indirecte) durant l'érythropoïèse chez les larves de *Xenopus laevis*.

D'autre part, chez la larve de xénope, les mitoses érythrocytaires ne sont que résiduelles : elles sont le reflet d'une activité mitotique plus intense qui se déroule au siège de l'érythropoïèse, le foie, essentiellement (Tsiftsoglou *et al.*, 2009). Les mitoses, de l'ordre de quelques pour mille dans le sang, n'offriraient pas une probabilité assez importante de voir apparaitre des micronoyaux tels que nous les observons (de l'ordre de quelques pour mille également). Autrement dit, l'action supposée du GO aurait bel et bien lieu dans le foie, comme représenté par la Figure 2. A ce jour, rien ne permet encore d'affirmer si cette action sur le foie serait due à des dommages directs (passage des nanoparticules dans le foie *via* la circulation sanguine) ou

indirects (stress oxydatif) suite à l'exposition au GO. Constater cet effet soulève toutefois la question du risque environnemental et sanitaire de cette nanoparticule de carbone à faible dose.

L'impact du GO sur le foie pourrait être source de dommages non seulement pour l'érythropoïèse, mais aussi pour d'autres fonctions métaboliques assurées par cet organe. Afin d'éclairer la compréhension des mécanismes de toxicité induits par le GO, le foie des xénopes a fait l'objet d'une analyse moléculaire (Chapitre 5). L'expression de 21 gènes impliqués dans différentes fonctions physiologiques a révélé différents degrés de réponses. Par exemple, *hif-1α*, marqueur de l'hypoxie, a été induit à toutes les concentrations de GO testées (0,1 à 10 $mg.L^{-1}$), en accord avec nos observations d'agglomérats de GO dans les branchies. L'induction de ce gène est la plus marquée à la plus faible concentration, conformément à notre hypothèse de plus grande biodisponibilité à cette dose. Faisant écho à *hif-1α*, le gène *epo* est d'ailleurs significativement induit à 0,1 $mg.L^{-1}$. Codant pour l'érythropoïétine, un facteur de croissance impliqué dans la production des globules rouges, *epo* est généralement induit pour lutter contre l'hypoxie (Fandrey, 2004). La surexpression d'*epo* à 0,1 $mg.L^{-1}$ est par ailleurs en accord avec la légère induction du nombre de mitoses érythrocytaires observées à cette même concentration (favorisant aussi la probabilité de formation des micronoyaux). Par la suite, les autres gènes étudiés ont pour la plupart montré une induction significative à la plus faible dose testée. C'est le cas de *cox1* et *12S*, dont le rapport des deux, en termes d'expression, témoigne d'une augmentation du réseau mitochondrial. Ceci suggère une production d'énergie pour répondre aux dommages causés. Cependant, le coût de l'activité mitochondriale peut se traduire par une augmentation de la production de ROS (Green *et al.*, 2004). Cela semble être le cas ici comme en témoigne l'induction de *sod(Mn)*, codant pour la superoxyde dismutase mitochondriale. D'autres gènes (*sod(Cu/Zn), gpx*) induits au niveau du noyau confirment l'existence d'un stress oxydatif significatif chez les larves exposées au GO. Ce stress oxydatif s'accompagne d'une réponse inflammatoire, marquée par l'induction de trois autres gènes (*pparγ, cyclo1, 5-lox*). Comme le stress oxydatif, la réponse inflammatoire observée peut avoir un pouvoir mutagène, voire cancérogène (Radmark et Samuelsson, 2009; Sales *et al.*, 2002), et être à l'origine de la génotoxicité observée. Par comparaison, la même étude moléculaire menée chez les xénopes exposés aux rGO200 et rGO1000 n'a conduit à aucune différence d'expression des gènes par rapport au témoin. Ici encore, les fonctions oxygénées du GO pourraient être à l'origine de cette différence.

Chez les larves exposées au GO, outre les systèmes de défense antioxydants, des processus de détoxification sont mis en œuvre. Ils concernent tout d'abord le métabolisme de phase I,

représenté par *cyp1a1*. Bien que les isoformes du cytochrome P450 prennent généralement en charge des polluants de type organique, certaines NPC peuvent aussi modifier leur activité (Che Abdullah *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2009). D'autre part, les HAP sont bien connus pour induire le métabolisme de phase I (Shimada et Fujii-Kuriyama, 2004). Bien que les traces de HAP détectées dans le GO aient été jugées insuffisantes pour induire de la génotoxicité, leur éventuel impact sur la réponse du gène *cyp1a1* ne peut pas être exclu en raison de la grande sensibilité de la réponse moléculaire. De plus, le métabolisme de phase I peut être couplé au métabolisme de phase II, consistant à conjuguer un contaminant avec une molécule plus hydrosoluble pour l'éliminer plus facilement (Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2006). Dans ce cas précis, la variabilité interindividuelle concernant l'expression du gène *gst*, couramment impliqué dans ce processus de détoxification, ne permet pas de mettre en évidence une induction significative par rapport au groupe contrôle. En revanche, l'induction de *tap* atteste d'une expulsion des composés toxiques hors des cellules.

Malgré la mise en évidence des dommages causés par le GO, nos résultats n'ont pas montré d'induction de réparation de l'ADN. Alors que le GO est connu pour provoquer des dommages chromosomiques (Liu *et al.*, 2013; Ou *et al.*, 2016), la réponse de certains gènes de réparation comme *rad51* est connue pour être très transitoire et revenir rapidement à un niveau d'expression basal (Liu *et al.*, 2013). Dans nos conditions expérimentales, un tel phénomène est envisageable puisque le principal risque posé par le GO aurait lieu dans les premières heures de contamination, avant qu'il ne sédimente (cf. Chapitre 4 et Annexe 4). Selon cette hypothèse, le temps de prélèvement (24 heures après la contamination) ne nous permettrait donc pas de voir cette réponse rapide des mécanismes de réparation. Une analyse moléculaire réalisée en cinétique sur 24h serait appropriée pour vérifier cette hypothèse. D'autre part, les dommages à l'ADN peuvent être de nature multiple, et les gènes que nous avons choisi d'étudier (*rad51*, *mut*) concernent la recombinaison homologue ou la réparation simple brin de l'ADN. De ce fait, les dommages à l'ADN pourraient être limités à des effets aneugènes ou des cassures doubles brins, comme les adduits à l'ADN peuvent d'ailleurs en produire (Dexheimer, 2013; Tammaro *et al.*, 2016).

La dernière fonction à avoir été étudiée est celle de la régulation du cycle cellulaire, pour laquelle nos résultats se sont montrés contrastés. Une induction de *p53* témoignant d'un arrêt du cycle cellulaire suggère deux possibilités, à savoir : permettre la réparation des dommages cellulaires, ou bien engager les cellules dans la voie de l'apoptose en cas d'échec des systèmes de réparation (Cejka *et al.*, 2003). Comme les systèmes de réparation ne semblent pas induits,

c'est la voie de l'apoptose qui est supposée être impliquée. Toutefois, l'induction simultanée de *bax* et *bcl2*, respectivement pro- et anti-apoptotiques, introduit une contradiction. Cela pourrait s'expliquer par l'ensemble cellulaire complexe au sein duquel l'expression des gènes est étudiée (Crawshaw et Weinkle, 2000), avec certaines cellules essayant de survivre, et d'autres au contraire de mourir. De plus, la larve de xénope est un organisme en constante évolution, impliquant un remplacement progressif des cellules larvaires par des cellules d'adultes, tout particulièrement au stade pré-métamorphique auquel nous l'utilisons (Shi, 1995). Des résultats préliminaires de mortalité cellulaire obtenus à partir de frottis sanguin colorés au bleu trypan n'ont par ailleurs révélé aucune mortalité significative par rapport au groupe contrôle. Ces résultats restent à confirmer par des études futures et des analyses en cytométrie en flux qui sont d'ores et déjà prévues.

Au final, bien que l'expression des gènes soit cohérente avec nos résultats d'induction des micronoyaux, rien ne permet encore de distinguer le mode d'action du GO, en termes d'effets directs ou indirects. Qui plus est, l'expression des gènes peut varier selon les tissus (Baldessari *et al.*, 2005), ce qui ouvre la voie à de nouvelles perspectives, comme l'étude d'organes en contact direct avec le GO (peau et branchies). De plus, une étude de l'activité enzymatique correspondant aux produits des gènes étudiés pourrait venir compléter cette analyse de l'expression des gènes. Quoi qu'il en soit, dans nos conditions expérimentales, les larves de *X. laevis* peuvent être considérées comme des bioindicateurs sensibles de la contamination au GO à faible dose.

3. L'oxyde de graphène : autres organismes, autres effets – vers une approche environnementalement plus pertinente : l'exposition en mésocosme.

En vue de définir le risque environnemental des nanoparticules de carbone, notre approche est vouée à s'élargir à d'autres espèces que *X. laevis*, et à étudier la réponse de ces espèces mises en interaction au sein d'un écosystème complexe. Il s'agit de reconstituer une chaine trophique expérimentale partant des producteurs primaires (bactéries, diatomées, feuilles d'aulne) jusqu'aux prédateurs (*Pleurodeles waltl.*), en passant par les consommateurs primaires (*X. laevis* et *Chironomus riparius*). Cette étude, à travers le mésocosme, est présentée à son commencement dans ce manuscrit, même si d'autres expérimentations en mésocosme ont déjà été menées avec des nanoparticules métalliques au laboratoire (Bour *et al.*, 2016). Le comportement du GO dans un écosystème et l'interaction entre les espèces offrent plus de

réalisme à nos résultats de toxicité, mais aussi, plus de difficultés d'interprétation. Avant tout, la complexité d'un tel système requiert une approche pas à pas pour en éclaircir la compréhension. Nous avons réalisé la première étape de cette démarche, à savoir une exposition directe des organismes, par espèce (*X. laevis*, *P. waltl.*, et *C. riparius*). Dans un avenir proche, il est aussi envisagé de mener cette étude chez les autres maillons de la chaîne trophique (diatomées et bactéries).

Ainsi, l'exposition monospécifique des pleurodèles au GO en conditions normalisées (ISO 21427-1, 2006) n'a révélé aucune mortalité, ni d'effet sur la croissance. Contrairement aux xénopes, les pleurodèles ne sont pas filtreurs, et ont été nourris avec des chironomes non contaminés, réduisant de beaucoup les quantités de GO retrouvées dans le tractus intestinal. Ceci pourrait donc expliquer l'absence d'inhibition de croissance, la plupart des nutriments fournis par les chironomes (consommés en quelques minutes) n'ayant pas le temps d'être séquestrés par les particules de GO. Par contre, les résultats de génotoxicité ont montré une induction significative des micronoyaux à toutes les concentrations testées (de 0,05 à 50 mg.L^{-1}). De tels résultats peuvent être attribués à différents phénomènes. En premier lieu, le siège de l'érythropoïèse (pendant laquelle a lieu la formation de micronoyaux) chez le pleurodèle n'est pas le foie, mais le sang et la rate (Flavin et Deparis, 1985). Aussi, le sang circulant pourrait être plus accessible que ne le serait le foie chez le xénope, ce qui expliquerait la plus grande sensibilité du pleurodèle. De plus, le potentiel génotoxique du GO n'est maintenant plus à démontrer. Cet effet s'exerce d'autant plus facilement que le nombre de divisions cellulaires est important. D'après nos résultats, les mitoses érythrocytaires augmentent régulièrement avec la concentration, favorisant de même la probabilité de formation des micronoyaux. Cette augmentation de l'indice mitotique pourrait elle-même être due non seulement au fait que les pleurodèles ne sont pas en déficit nutritionnel (contrairement à ce qui a été supposé pour les xénopes), et aussi, éventuellement, à leur comportement nutritif. Comme les pleurodèles ne filtrent pas la colonne d'eau, nos observations ont montré que le GO était maintenu plus longtemps en suspension, garantissant un contact à long terme (à l'échelle de 24h) avec la peau et les branchies des organismes. Ces organes étant les seuls garantissant la respiration des pleurodèles à ce stade (Shi et Boucaut, 1995), il est possible de soupçonner la présence d'hypoxie chez les larves, d'autant plus que la dose augmente (les particules libres ou agrégées pourraient jouer le même rôle d'obstruction des organes respiratoires). Par conséquent, comme observé chez le xénope, l'induction du gène codant l'érythropoïétine pourrait entrainer un recrutement de plus de globules rouges. Au final, le pleurodèle est un modèle biologique plus

sensible encore que ne l'est le xénope, et qu'il est pertinent d'utiliser comme bioindicateur dans une chaine trophique exposée à de faibles doses de GO.

Par ailleurs, les larves de *Chironomus riparius* ont-elles aussi fait l'objet d'une exposition monospécifique au GO en conditions normalisées (AFNOR, 2004). Connue pour être ubiquiste, cette espèce peut se montrer relativement résistante aux polluants (Simiao-Ferreira *et al.*, 2009). Il se trouve que nos résultats ne montrent aucune mortalité des larves de chironome à toutes les concentrations testées, ni aucune toxicité significative du GO à 0,1 $mg.L^{-1}$, confirmant le caractère résistant de cette espèce par comparaison aux amphibiens. Chez *C. riparius*, c'est un effet dose-dépendant qui se produit sur les biomarqueurs étudiés (excepté la mortalité). Il se manifeste significativement dès 10 $mg.L^{-1}$ sur l'inhibition de croissance, et dès 50 $mg.L^{-1}$ sur le retard de développement. Des agglomérats de GO ont été identifiés dans les intestins de *C. riparius*, qui est non seulement brouteur mais aussi capable de filtration (Walshe, 1947). Les mêmes hypothèses que précédemment peuvent de nouveau être émises pour expliquer ces résultats, à savoir une séquestration des nutriments par le GO, dont les charges négatives des groupes oxygénés peuvent se lier à des cations métalliques essentiels (Cho *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2013), et dont les domaines graphéniques peuvent adsorber des macromolécules hydrophobes (Guo *et al.*, 2008). De plus, les larves étant exposées de manière statique, elles sont constamment au contact du GO sédimenté, ce qui peut occasionner chez elles certains dommages et s'en ressentir sur l'énergie allouée à la croissance. Par exemple, certains auteurs ont décrit une hyperactivité des glandes salivaires des chironomes exposés aux nanotubes de carbone, associée à une hyper-compensation cellulaire pour réduire le stress occasionné par le contaminant et restaurer l'homéostasie des cellules (Gusev *et al.*, 2012). Le retard de développement observé parallèlement à l'inhibition de croissance pourrait également provenir de ce supposé déficit énergétique. Par ailleurs, les résultats portant sur la tératogénicité du GO ont aussi montré un effet dose-dépendant, tant sur les fréquences de déformations du mentum que sur leur gravité (résultats significatifs dès 1 $mg.L^{-1}$). Le détail de l'analyse des déformations nous a aussi montré que pour un mentum déformé donné, le nombre de dents touchées par les déformations augmentait avec la concentration. L'augmentation du score de sévérité avec la dose serait ainsi attribuée à une accumulation de petites déformations plutôt qu'à des déformations de grande ampleur. Les déformations se produisant au cours de mues larvaires successives (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1992), le GO pourrait avoir une influence négative sur les hormones contrôlant la mue (Meregalli *et al.*, 2001), ou encore sur des gènes pouvant être impliqués dans des modifications physiologiques, tels que *hsp40* et *hsp70* (Park et

Kwak, 2008). De plus, les types de déformations évoluent en fonction de la concentration, certains devenant de plus en plus représentés au fur et à mesure que la dose augmente. Ce résultat illustre la complexité des mécanismes à l'origine de la tératogénicité. A ce jour, ce biomarqueur ne bénéficie pas encore de réelle comparaison entre NPC, ce qui limite la compréhension des phénomènes. Des résultats préliminaires des chironomes exposés aux rGO200 et rGO1000 ont montré moins de toxicité qu'avec le GO, laissant suspecter une nouvelle fois l'implication des fonctions oxygénées dans le potentiel toxique de la particule, mais la tératogénicité des rGO n'a pas encore été étudiée. Quoi qu'il en soit, les larves de chironome ont montré une résistance au GO à faible dose (0,1 $mg.L^{-1}$). A dose environnementale, cette espèce parait donc peu susceptible d'être impactée par le GO. Par contre, la bioaccumulation qu'elle peut représenter, ne serait-ce que dans son tractus digestif, et la réorganisation de la répartition du GO par sa bioturbation ne doivent pas être négligées quant à son impact éventuel sur les prédateurs. En particulier, ces relations sont d'autant plus importantes à considérer si la sensibilité des prédateurs est avérée dès les plus faibles niveaux de contamination, comme c'est le cas des pleurodèles étudiés.

Historiquement, l'évaluation des effets écotoxicologiques des nanoparticules de carbone repose sur des méthodologies utilisées pour des contaminants « classiques ». Pour des contaminants émergents comme les NPC manufacturées, ces méthodes ont permis de définir des seuils de toxicité. Toutefois, les résultats obtenus lors des essais monospécifiques en conditions normalisées doivent être comparés avec prudence aux résultats obtenus en mésocosme, pour la simple raison que les systèmes d'exposition sont très différents l'un de l'autre (ne serait-ce que par la nature de l'eau utilisée : de l'eau de Volvic® en mésocosme et de l'eau déionisée reconstituée en essais monospécifiques). Ainsi, l'exposition à de faibles doses de GO (0,05 et 0,1 $mg.L^{-1}$) n'a induit aucune toxicité significative chez les larves de chironome, en accord avec le test monospécifique. D'une manière générale, les chironomes ont été largement prédatés par les pleurodèles comme en attestent leur faibles taux de survie quelle que soit la condition expérimentale. De même, les xénopes, introduits dans la chaine trophique à seule fin nutritive pour les pleurodèles, ont rapidement et totalement été prédatés. Par conséquent, la potentielle bioaccumulation du GO par ses proies a pu avoir un impact sur le pleurodèle *via* l'ingestion. Cependant, ce prédateur ne montre de génotoxicité significative qu'à 0,1 $mg.L^{-1}$, et apparait donc moins sensible au GO que lors de l'essai normalisé. Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant cette différence à 0,05 $mg.L^{-1}$: (i) en supposant qu'il y ait bioaccumulation du GO le long de la chaine trophique, celle-ci n'est pas nécessairement synonyme de toxicité,

comme montré avec des nanoparticules de cérium (Bour *et al.*, 2016). Encore faudrait-il le vérifier avec le GO, en réalisant une expérimentation intermédiaire où le pleurodèle serait exposé à des chironomes (et/ou des xénopes) contaminés mais dans un milieu exempt de contaminant, pour connaitre l'influence de la voie digestive seule sur la génotoxicité. (ii) Par ailleurs, au sein du mésocosme, le GO peut être piégé par le biofilm algal et bactérien. Il pourrait notamment, de même que le graphène multi-feuillet et les nanotubes de carbone, se retrouver emprisonné par les substances exo-polymériques sécrétées par *Nitzschia palea* (Garacci *et al.*, 2017; Verneuil *et al.*, 2014). La colonne d'eau serait alors peu à peu épurée et le GO serait moins en contact avec la peau et les branchies des pleurodèles, qui sont de possibles voies de génotoxicité. (iii) Enfin, les mitoses érythrocytaires des larves de pleurodèle en fin d'expérimentation ont montré des taux extrêmement faibles, limitant fortement les probabilités de formation des micronoyaux et donc la sensibilité des larves. Le stade des pleurodèles était plus avancé que celui des organismes utilisés en essai monospécifique, ce qui suggère que le risque environnemental du GO à 0,05 $mg.L^{-1}$ a peut-être été sous-estimé dans nos expérimentations.

D'autre part, certains ajustements du système sont encore nécessaires en vue d'améliorer son fonctionnement et d'affiner sa réponse au GO. Outre le choix du stade des organismes, il faudrait envisager de supplémenter le milieu en nourriture pour les herbivores, dont la croissance (chironomes) s'est avérée très réduite. Les premiers résultats obtenus soulignent ainsi la difficulté de mise en œuvre d'un système qui soit auto-suffisant pour chaque maillon de la chaîne trophique, tout en fonctionnant en circulation fermée. Au lieu d'un milieu trop pauvre, inversement, il y aurait un risque de basculer vers un système saturé en déchets et en ammoniac, nitrites et nitrates, pouvant être toxiques pour les organismes (Adelman *et al.*, 2009). A ce jour, cette étude en mésocosme n'est encore que prospective, d'autant plus que plusieurs hypothèses biologiques reposent sur des résultats en cours d'acquisition. En particulier, l'analyse des communautés bactériennes pourrait permettre d'éclaircir l'interprétation des résultats de la dégradation foliaire (significatifs à 0,05 mais pas à 0,1 $mg.L^{-1}$, cf. Chapitre 7). Néanmoins, nos résultats en mésocosme offrent un bon aperçu des interactions interspécifiques pouvant influencer la toxicité du GO dans l'environnement.

Hormis certaines limites propres à notre expérimentation (milieu fermé, autosuffisance du système, nombre et stade des organismes, durée d'expérimentation, etc.), étudier l'impact du GO (ou des NPC en général) selon un point de vue environnementalement réaliste représente actuellement un défis. Prévoir quel serait le risque écotoxicologique réel du GO est une équation

qui comporte encore de nombreuses inconnues. L'obtention d'un résultat d'écotoxicité, comme « un instantané », permet difficilement de reconstituer toute la séquence d'évènements ayant pu se dérouler pour y aboutir, à moins d'avoir une compréhension suffisamment fine des mécanismes impliqués. Avant d'être d'ordre purement physiologique, ces mécanismes concernent le comportement des particules dans un milieu aquatique complexe, dont dépendent la distribution, la biodisponibilité et la toxicité de ces dernières. Après libération des NPC dans l'environnement aquatique, plusieurs verrous technologiques font pourtant obstacle à leur traçage. Concernant le GO, certains scénarios de répartition dans le milieu (voire dans les organismes) pourraient éventuellement être approchés par dosage des résidus métalliques, dont la concentration est désormais connue dans le matériau de départ, à condition bien-sûr que ces derniers ne soient pas désorbés du GO (à cause du pH par exemple), et que leur concentrations ne soient pas inférieures au seuil de détection des appareils de mesure (ICP). En outre, peu de données existent actuellement sur la transformation des NPC dans les écosystèmes dulçaquicoles. Vale *et al.* (2016) soulignent que les nanoparticules peuvent être exposées à des environnements physico-chimiques hautement variables, et dynamiques, capables de leur infliger diverses transformations, réversibles ou pas : adsorption de matière organique, agrégation, sédimentation, voire biodégradation. Autant de facteurs qui, comme nous l'avons vu, peuvent conditionner la toxicité. Un autre point qui n'est pas directement abordé dans ces travaux de thèse concerne l'adsorption d'autres contaminants environnementaux (organiques et inorganiques : pesticides, métaux lourds, etc.) à la surface des NPC, ce qui pourrait avoir pour effet de concentrer la pollution (Ersan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2003). Etudier l'écotoxicité d'un mélange de contaminants sur la chaîne trophique pourrait donner une perspective intéressante à ces travaux.

En guise de conclusion sur les effets environnementaux des NPC en milieu aquatique, nous proposons en Figure 3 une représentation schématique des étapes de transfert des NPC dans l'environnement, depuis leur libération jusqu'à leur bioaccumulation supposées dans les derniers maillons des chaînes trophiques. A l'échelle de l'organisme, une multitude de facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer la toxicité des NPC comme nous l'avons décrit. A l'échelle des populations et des communautés, ces mêmes facteurs pourraient avoir d'autres conséquences : stratégies d'évitement de la pollution, résistance, résilience, effets à long terme sur la descendance, disparition des espèces sensibles, appauvrissement de la richesse spécifique, changement de la composition des communautés, modification fonctionnelle des écosystèmes, etc. Des travaux basés sur des approches communautaires pourraient être un point pertinent à

développer dans une optique d'évaluation du risque environnemental. Même si les connaissances relatives à l'écotoxicité des NPC tendent à se renforcer, de nombreuses questions restent encore en suspens à ce jour pour ce qui est de l'estimation des quantités libérées, et de leur effet réel sur l'environnement.

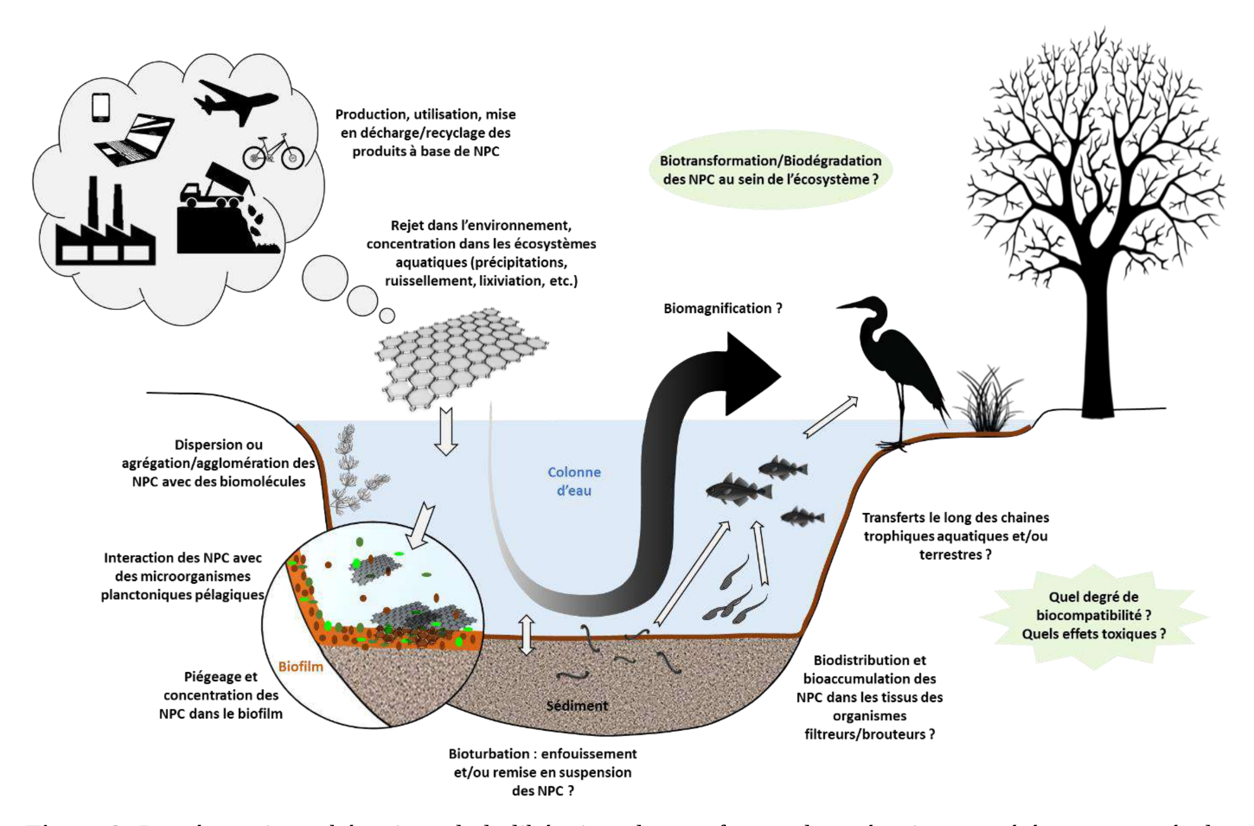


Figure 3. Représentation schématique de la libération, du transfert, et des mécanismes avérés ou supposés des nanoparticules de carbone (NPC) dans l'environnement.

Références bibliographiques

Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egypt. J. Pet. 25, 107‑123. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011

Adelman, I.R., Kusilek, L.I., Koehle, J., Hess, J., 2009. Acute and chronic toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the endangered Topeka shiner (Notropis topeka) and Fathead minnows (Pimephales promelas). Environ. Toxicol. Chem. 28, 2216‑2223. doi:10.1897/08-619.1

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., V. Lowry, G., Jolivet, J.-P., R. Wiesner, M., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nat. Nanotechnol. 4, 634‑641. doi:10.1038/nnano.2009.242

B. Saleh, N., D. Pfefferle, L., Elimelech, M., 2010. Influence of biomacromolecules and humic acid on the aggregation kinetics of single-walled carbon nanotubes. Environ. Sci. Technol. 44, 2412‑2418. doi:10.1021/es903059t

Baldessari, D., Shin, Y., Krebs, O., König, R., Koide, T., Vinayagam, A., Fenger, U., Mochii, M., Terasaka, C., Kitayama, A., Peiffer, D., Ueno, N., Eils, R., W. Cho, K., Niehrs, C., 2005. Global gene expression profiling and cluster analysis in Xenopus laevis. Mech. Dev. 122, 441‑475. doi:10.1016/j.mod.2004.11.007

Bianco, A., 2013. Graphene: safe or toxic? The two faces of the medal. Angew. Chemie - Int. Ed. doi:10.1002/anie.201209099

Boncel, S., Kyzioł-Komosińska, J., Krzyżewska, I., Czupioł, J., 2015. Interactions of carbon nanotubes with aqueous/aquatic media containing organic/inorganic contaminants and selected organisms of aquatic ecosystems – A review. Chemosphere 136, 211‑221. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.095

Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Verneuil, L., Baqué, D., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., Pagnout, C., Clivot, H., Fourquaux, I., Tella, M., Auffan, M., Laury, G., Pinelli, E., 2016. Toxicity of CeO2 nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: a study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. Nanotoxicology 10, 245‑255. doi:10.3109/17435390.2015.1053422

Bradley, M.C., Perrin, N., Calow, P., 1991. Energy allocation in the cladoceran Daphnia magna Straus, under starvation and refeeding. Oecologia 86, 414‑418. doi:10.1007/BF00317610

Burggren, W.W., Feder, M.E., Pinder, A.W., 1983. Temperature and the balance between aerial and aquatic respiration in larvae of Rana berlandieri and Rana catesbeiana. Physiol. Zool. 56, 263‑273. doi:30156058

Cejka, P., Stojic, L., Mojas, N., Russell, A.M., Heinimann, K., Cannavo, E., di Pietro, M., Marra, G., Jiricny, J., 2003. Methylation-induced G2/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. EMBO J. 22, 2245‑2254. doi:10.1093/emboj/cdg216

Che Abdullah, C.A., Lewis Azad, C., Ovalle-Robles, R., Fang, S., Lima, M.D., Lepró, X., Collins, S., Baughman, R.H., Dalton, A.B., Plant, N.J., Sear, R.P., 2014. Primary liver cells cultured on carbon nanotube substrates for liver tissue engineering and drug discovery applications. ACS Appl. Mater. Interfaces 6, 10373‑10380. doi:10.1021/am5018489

Chen, M., Yin, J., Liang, Y., Yuan, S., Wang, F., Song, M., Wang, H., 2016. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. Aquat. Toxicol. 174, 54‑60. doi:10.1016/j.aquatox.2016.02.015

Cheng, J., Man Chan, C., Veca, L.M., Lin Poon, W., Kwok Chan, P., Qu, L., Sun, Y., Han Cheng, S., 2009. Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (Danio rerio). Toxicol. Appl. Pharmacol. 235, 216‑225. doi:10.1016/j.taap.2008.12.006

Cho, H.-H., Wepasnick, K., A. Smith, B., K. Bangash, F., Fairbrother, D.H., P. Ball, W., 2010. Sorption of aqueous Zn[II] and Cd[II] by multiwall carbon nanotubes: The relative roles of oxygen-containing functional groups and graphenic carbon. Langmuir 26, 967‑981. doi:10.1021/la902440u

Chowdhury, I., Duch, M.C., Mansukhani, N.D., Hersam, M.C., Bouchard, D., 2013. Colloidal properties and stability of graphene oxide nanomaterials in the aquatic environment. Environ. Sci. Technol.

47, 6288‑6296. doi:10.1021/es400483k

Crawshaw, G.J., Weinkle, T.K., 2000. Clinical and pathological aspects of the amphibian liver. Semin. Avian Exot. Pet Med. 9, 165‑173. doi:10.1053/ax.2000.7133

Daignan-fornier, B., Sagot, I., 2011. Proliferation/Quiescence: when to start? Where to stop? What to stock ? Cell Div. 6, 1‑5. doi:10.1242/jcs.108886

Dexheimer, T.S., 2013. DNA Repair of Cancer Stem Cells, in: Mathews, L.A., Cabarcas, S.M., Hurt, E.M. (Éd.), DNA repair of cancer stem cells. Springer Netherlands, p. 19‑32. doi:10.1007/978-94-007-4590-2_2

E. Morales, A., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellan, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver. Comp. Biochem. Physiol. Part C 139, 153‑161. doi:10.1016/j.cca.2004.10.008

Ema, M., Gamo, M., Honda, K., 2017. A review of toxicity studies on graphene-based nanomaterials in laboratory animals. Regul. Toxicol. Pharmacol. 85, 7‑24. doi:10.1016/j.yrtph.2017.01.011

Ema, M., Gamo, M., Honda, K., 2016. A review of toxicity studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals. Regul. Toxicol. Pharmacol. 74, 42‑63. doi:10.1016/j.yrtph.2015.11.015

Ersan, G., Apul, O.G., Perreault, F., Karanfil, T., 2017. Adsorption of organic contaminants by graphene nanosheets: a review. Water Res. doi:10.1016/j.watres.2017.08.010

Fandrey, J., 2004. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 286, R977‑R988. doi:10.1152/ajpregu.00577.2003

Fernandes, A.L., Josende, M.E., Nascimento, J.P., Santos, A.P., Sahoo, S.K., da Silva Junior, F.M.R., Romano, L.A., Furtado, C.A., Wasielesky, W., Monserrat, J.M., Ventura-Lima, J., 2017. Exposure to few-layer graphene through diet induces oxidative stress and histological changes in the marine shrimp Litopenaeus vannamei. Toxicoly Res. doi:10.1039/C6TX00380J

Flavin, M., Deparis, P., 1985. Globin gene expression in erythroid cell lines during larval development of Pleurodeles waltlii. Cell Differ. 16, 203‑209.

Fuccelli, R., Sepporta, M.V., Rosignoli, P., Morozzi, G., Servili, M., Fabiani, R., 2014. Preventive activity of olive oil phenolic compounds on alkene epoxides induced oxidative DNA damage on human peripheral blood mononuclear cells. Nutr. Cancer 66, 1322‑1330. doi:10.1080/01635581.2014.956251

Garacci, M., Barret, M., Mouchet, F., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Flahaut, E., Gauthier, L., Silvestre, J., Pinelli, E., 2017. Few layer graphene sticking by biofilm of freshwater diatom Nitzschia palea as a mitigation to its ecotoxicity. Carbon N. Y. 113, 139‑150. doi:10.1016/j.carbon.2016.11.033

Georgakilas, V., Bourlinos, A., Gournis, D., Tsoufis, T., Trapalis, C., Mateo-Alonso, A., Prato, M., 2008. Multipurpose organically modified carbon nanotubes: from functionalization to nanotube composites. J. Am. Chem. Soc. 130, 8733‑8740. doi:10.1021/ja8002952

Georgakilas, V., Otyepka, M., Bourlinos, A.B., Chandra, V., Kim, N., Kemp, K.C., Hobza, P., Zboril, R., Kim, K.S., 2012. Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications. Chem. Rev. 112, 6156‑6214. doi:10.1021/cr3000412

Green, K., Brand, M.D., Murphy, M.P., 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. Diabetes 53, 110‑118. doi:10.2337/diabetes.53.2007.s110

Grillo, R., Rosa, A.H., Fraceto, L.F., 2015. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. Chemosphere 119, 608‑619. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.049

Guo, L., Von Dem Bussche, A., Buechner, M., Yan, A., Kane, A.B., Hurt, R.H., 2008. Adsorption of essential micronutrients by carbon nanotubes and the implications for nanotoxicity testing. Small

4, 721‐727. doi:10.1002/smll.200700754

Guo, X., Mei, N., 2014. Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. J. Food Drug Anal. 22, 105‐115. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.009

Gusev, A.A., Fedorova, I.A., Tkachev, A.G., Kuznetsov, D. V., Polyakova, I.A., 2012. Acute toxic and cytogenetic effects of carbon nanotubes. Nanotechnologies Russ. 7, 509‐516. doi:10.1134/S1995078012050060

Hilding, J., Grulke, E.A., George Zhang, Z., Lockwood, F., 2003. Dispersion of Carbon Nanotubes in Liquids. J. Dispers. Sci. Technol. 24, 1‐41. doi:10.1081=DIS-120017941

ISO 21427-1, 2006. Water Quality-Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei-Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae; International Organization for Standardization. Geneva.

J. Edgington, A., P. Roberts, A., M. Taylor, L., M. Alloy, M., Reppert, J., M. Rao, A., Mao, J., J. Klaine, S., 2010. The influence of natural organic matter on the toxiciy of multiwalled carbon nanotubes. Environ. Toxicol. Chem. 29, 2511‐2518. doi:10.1002/etc.309

J. Petersen, E., A. Pinto, R., J. Mai, D., F. Landrum, P., J. Weber JR., W., 2011. Influence of polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to Daphnia magna. Environ. Sci. Technol. 45, 1133‐1138. doi:10.1021/es1030239

Janssens de Bisthoven, L.G., Timmermans, K.R., Ollevier, F., 1992. The concentration of cadmium, lead, copper and zinc in Chironomus gr. thummi larvae (diptera, chironomidae) with deformed versus normal menta. Hydrobiologia 239, 141‐149.

Ji, Z., Zhang, D., Li, L., Shen, X., Deng, X., Dong, L., Wu, M., Liu, Y., 2009. The hepatotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in mice. Nanotechnology 20, 1‐9. doi:10.1088/0957-4484/20/44/445101

Klein, C., Costa, M., 2014. Nickel, in: Nordberg, G., Fowler, B., Nordberg, M. (Éd.), Handbook on the toxicology of metals.

Leuratti, C., Jones, N.J., Marafante, E., Kostiainen, R., Peltonen, K., Waters, R., 1994. DNA damage induced by the environmental carcinogen butadiene: identification of a diepoxybutane-adenine adduct and its detection by 32P-postlabelling. Carcinogenesis 15, 1903‐1910. doi:10.1093/carcin/15.9.1903

Li, D., Y. Lyon, D., Li, Q., J.J. Alvarez, P., 2008. Effect of soil sorption and aquatic natural organic matter on the antibacterial activity of a fullerene water suspension. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1888‐1894. doi:10.1897/07-548.1

Li, Y.-H., Ding, J., Luan, Z., Di, Z., Zhu, Y., Xu, C., Wu, D., Wei, B., 2003. Competitive adsorption of Pb2+, Cu2+ and Cd2+ ions from aqueous solutions by multiwalled carbon nanotubes. Carbon N. Y. 41, 2787‐2792. doi:10.1016 /S0008-6223(03)00392-0

Liu, Y., Luo, Y., Wu, J., Wang, Y., Yang, X., Yang, R., Wang, B., Yang, J., Zhang, N., 2013. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis. Sci. Rep. 3, 1‐8. doi:10.1038/srep03469

Lucchini, R.G., Aschner, M., Kim, Y., Saric, M., 2014. Manganese, in: Nordberg, G., Fowler, B., Nordberg, M. (Éd.), Handbook on the toxicology of metals.

Luczaj, W., Skrzydlewska, E., 2003. DNA damage caused by lipid peroxidation products. Cell. Mol. Biolology Lett. 8, 391‐413.

Marnett, L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 21, 361‐370. doi:10.1093/carcin/21.3.361

Meregalli, G., Pluymers, L., Ollevier, F., 2001. Induction of mouthpart deformities in Chironomus riparius larvae exposed to 4-n-nonylphenol. Environ. Pollut. 111, 241–246. doi:10.1016/S0269-7491(00)00068-3

Monopoli, M.P., Åberg, C., Salvati, A., Dawson, K.A., 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. Nat. Nanotechnol. 7, 779–786. doi:10.1038/nnano.2012.207

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ. Health Perspect. 113, 823–839. doi:10.1289/ehp.7339

Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., Sun, T., Shao, L., 2016. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. Part. Fibre Toxicol. 13, 1–24. doi:10.1186/s12989-016-0168-y

P. Fu, P., Xia, Q., Hwang, H., C. Ray, P., Yu, H., 2014. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. J. Food Drug Anal. 22, 64–75. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.005

Park, K., Kwak, I.-S., 2008. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in Chironomus riparius larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. Chemosphere 74, 89–95. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.041

Park, S., An, J., Jung, I., Piner, R.D., Jin An, S., Li, X., Velamakanni, A., Ruoff, R.S., 2009. Colloidal Suspensions of Highly Reduced Graphene Oxide in a Wide Variety of Organic Solvents. Nano Lett. 9, 1593–1597. doi:10.1021/nl803798y

Petersen, E.J., Henry, T.B., Zhao, J., MacCuspie, R.I., Kirschling, T.L., Dobrovolskaia, M.A., Hackley, V., Xing, B., White, J.C., 2014. Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. Environ. Sci. Technol. 48, 4226–4246. doi:10.1021/es4052999

Radmark, O., Samuelsson, B., 2009. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. J. Lipid Res. 50, S40–S45. doi:10.1194/jlr.R800062-JLR200

Sales, K.J., Katz, A.A., Howard, B., Soeters, R.P., Millar, R.P., Jabbour, H.N., 2002. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin E receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. Cancer Res. 62, 424–432.

Sanchez, V.C., Jachak, A., Hurt, R.H., Kane, A.B., 2012. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. Chem. Res. Toxicol. 25, 15–34. doi:10.1021/tx200339h

Saria, R., Mouchet, F., Perrault, A., Flahaut, E., Laplanche, C., Boutonnet, J., Pinelli, E., Gauthier, L., 2014. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in Xenopus laevis tadpoles. Ecotoxicol. Environ. Saf. 107, 22–29. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.05.010

Sasidharan, A., Swaroop, S., Chandran, P., Nair, S., Koyakutty, M., 2016. Cellular and molecular mechanistic insight into the DNA damaging potential of few-layer graphene in human primary endothelial cells. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 12, 1347–1355. doi:10.1016/j.nano.2016.01.014

Seabra, A.B., Paula, A.J., De Lima, R., Alves, O.L., Durán, N., 2014. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. Chem. Res. Toxicol. 27, 159–168. doi:10.1021/tx400385x

Seale, D.B., Hoff, K., Wassersug, R., 1982. Xenopus laevis larvae (Amphibia, Anura) as model suspension feeders. Hydrobiologia 87, 161–169. doi:10.1007/BF00015196

Seidel, H.S., Kimble, J., 2015. Cell-cycle quiescence maintains Caenorhabditis elegans germline stem

cells independent of GLP-1/Notch. Elife 4, 1‐28. doi:10.7554/eLife.10832

Shi, D.-L., Boucaut, J.-C., 1995. The chronological development of the urodele amphibian Pleurodeles waltl (Michah). Int. J. Dev. Biol. 39, 427‐441.

Shi, Y.-B., 1995. Cell-cell and cell-ECM interactions in epithelial apoptosis and cell renewal during frog intestinal development. Cell Biochem. Biophys. 27, 179‐202.

Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y., 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. Cancer Sci. 95, 1‐6.

Simiao-Ferreira, J., DeMarco, P.J., Mazao, G.R., Carvalho, A.R., 2009. Chironomidae assemblage structure in relation to organic enrichment of an aquatic environment. Neotrop. Entomol. 38, 464‐471. doi:10.1590/S1519-566X2009000400004

Smith, B., Wepasnick, K., Schrote, K.E., Cho, H., Ball, W.P., Fairbrother, D.H., 2009. Influence of Surface Oxides on the Colloidal Stability of Multi-Walled Carbon Nanotubes: A Structure-Property Relationship. Langmuir Artic. 25, 9767‐9776. doi:10.1021/la901128k

Tammaro, M., Liao, S., Beeharry, N., Yan, H., 2016. DNA double-strand breaks with 5′ adducts are efficiently channeled to the DNA2-mediated resection pathway. Nucleic Acids Res. 44, 221‐231. doi:10.1093/nar/gkv969

Tsiftsoglou, A.S., Vizirianakis, I.S., Strouboulis, J., 2009. Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. IUBMB Life 61, 800‐830. doi:10.1002/iub.226

Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F., 2016. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. Aquat. Toxicol. 170, 162‐174. doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.019

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.-C., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2014. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea: « A sticky story ». Nanotoxicology 5390, 1‐11. doi:10.3109/17435390.2014.918202

Walshe, B.M., 1947. Feeding mechanisms of Chironomus larvae. Nature 160, 474.

Wang, Y., Wang, J., Mu, J., Wang, Z., Cong, Y., Yao, Z., Lin, Z., 2016. Aquatic predicted no-effect concentrations of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons and their ecological risks in surface seawater of Liaodong Bay, China. Environ. Toxicol. Chem. 35, 1587‐1593. doi:10.1002/etc.3295

Wislocki, P.G., Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Yagi, H., Hernandez, O., Jerina, D.M., Conney, A.H., 1976. High mutagenicity and toxicity of diol epoxide derived from benzo[a]pyrene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1006‐1012.

Wu, S.-Y., An, S.S.A., Hulme, J., 2015. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. Int. J. Nanomedicine 10, 9‐24. doi:10.2147/IJN.S88285

Yang, K., Xing, B., 2009. Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water. Environ. Pollut. 157, 1095‐1100. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.007

Yang, K., Xing, B., 2007. Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from carbon nanomaterials in water. Environ. Pollut. 145, 529‐537. doi:10.1016/j.envpol.2006.04.020

Zamek-Gliszczynski, M.J., Hoffmaster, K.A., Nezasa, K., Tallman, M.N., Brouwer, K.L.R., 2006. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. Eur. J. Pharm. Sci. 27, 447‐486. doi:10.1016/j.ejps.2005.12.007

Zhang, M., Yu, Q., Liang, C., Liu, Z., Zhang, B., Li, M., 2016. Graphene oxide induces plasma membrane damage, reactive oxygen species accumulation and fatty acid profiles change in Pichia

pastoris. Ecotoxicol. Environ. Saf. 132, 372‑378. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.06.031

Zhao, J., Wang, Z., White, J.C., Xing, B., 2014. Graphene in the aquatic environment: adsorption, dispersion, toxicity and transformation. Environ. Sci. Technol. 48, 9995‑10009. doi:10.1021/es5022679

Zhao, X., 2011. Self-assembly of DNA segments on graphene and carbon nanotube arrays in aqueous solution: a molecular simulation study. J. Phys. Chem. C 115, 6181‑6189. doi:10.1021/jp110013r

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Chapitre 1

Chapitre 2

<u>Chapitre 3</u>

1. Un modèle pour décrire la toxicité de différents allotropes de carbone chez *X. laevis* : la surface spécifique comme meilleur descripteur de l'inhibition de croissance

<u>Surface Area of Carbon Nanoparticles: A Dose Metric for a More Realistic Ecotoxicological Assessment, *Nano Letters*, 2016</u>.

2. La croissance de *X. laevis* en présence de nanoparticules de carbone dispersées de manière covalente ou non-covalente : une relation surface/effet toujours valable

<u>Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians, *Carbon*, 2017</u>.

Chapitre 4

1. Evaluation de la génotoxicité chez *X. laevis*

2. Génotoxicité chez *X. laevis* après exposition à différentes NPC brutes

3. Le rôle du degré d'oxydation dans la génotoxicité - Le cas de l'oxyde de graphène

Removal of genotoxicity of graphene oxide in vivo: towards an environmentally safe-by-design approach

Supporting Information

4. Génotoxicité du GO chez le xénope : prolongement et perspectives

Chapitre 5

Influence of the oxidation level of graphene oxide on its toxicity in the liver of *Xenopus laevis*: a molecular approach

Chapitre 6

1. Evaluation des effets du GO chez *Chironomus riparius*

In vivo toxicity of graphene oxide in larvae of the Diptera *Chironomus riparius*

2. Résultats préliminaires des effets des rGO chez *Chironomus riparius*

Chapitre 7

Discussion générale, conclusion et perspectives

ANNEXES

Annexe 1

Composition de la nourriture et des milieux d'élevage des organismes

Composition de l'eau d'élevage et d'exposition de *Chironomus riparius* (AFNOR, 2004) :

Sels	Concentration finale dans le milieu ($mg.L^{-1}$)
$CaCl_2, 2H_2O$	66,2
$MgSO_4, 7H_2O$	61,4
$NaHCO_3$	96
KCl	4
$CaSO_4, 2H_2O$	63
NaBr	1

Composition de l'eau d'exposition de *Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl.* (ISO 21427-1, 2006)

Sels	Concentration finale dans le milieu ($mg.L^{-1}$)
$CaCl_2, 2H_2O$	294
$MgSO_4, 7H_2O$	123,25
$NaHCO_3$	64,75
KCl	5,75

Composition de l'eau minérale Volvic® (d'après les informations indiquées par le fournisseur)

Sels	Concentration ($mg.L^{-1}$)
Calcium	12
Sulfates	9
Magnésium	8
Sodium	12
Bicarbonates	74
Potassium	6
Silice	32
Chlorures	15
Nitrates	7,3
Teneur totale en sels minéraux (résidus sec à 180°C)	130
Autre : pH 7	

Composition de l'aliment en flocon TetraMin® (d'après les informations indiquées par le fournisseur)

Ingrédients : poisson et sous-produits de poisson, céréales, levures, extraits de protéines végétales, mollusques et crustacés, huiles et graisses, algues, sucre, minéraux.

Composition analytique :

Constituants	Quantité
Protéines brutes	47,0 %
Matières grasses brutes	10,0 %
Cellulose brute	3,0 %
Teneur en eau	6,0 %
Vitamine A	37600 $UI.kg^{-1}$
Vitamine D	2000 $UI.kg^{-1}$
Manganèse [E5]	96 $mg.kg^{-1}$
Zinc [E6]	57 $mg.kg^{-1}$
Fer [E1]	37 $mg.kg^{-1}$
Cobalt [E3]	0,7 $mg.kg^{-1}$
Colorants	Non renseigné
Antioxidants	Non renseigné

Composition de l'aliment en flocon Tetraphyll® (d'après les informations indiquées par le fournisseur)

Ingrédients : poissons et sous-produits de poisons, céréales, levures, extraits de protéines végétales, mollusques et crustacés, huiles et graisses, algues, sucres, substances minérales.

Composition analytique :

Constituants	Quantité
Protéines brutes	47,0 %
Matières grasses brutes	8,5 %
Cellulose brute	2,0 %
Teneur en eau	6,0 %
Vitamine A	31220 $UI.kg^{-1}$
Vitamine D3	1717 $UI.kg^{-1}$
Manganèse [E5]	96 $mg.kg^{-1}$
Zinc [E6]	57 $mg.kg^{-1}$
Fer [E1]	37 $mg.kg^{-1}$
Cobalt [E3]	0,7 $mg.kg^{-1}$
Colorants	Non renseigné
Antioxidants	Non renseigné

Références bibliographiques

AFNOR, 2004. XP T 90-339-1. Détermination de la toxicité des sédiments vis-à-vis de Chironomus riparius.

ISO 21427-1, 2006. Water Quality-Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei-Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae; International Organization for Standardization. Geneva.

Annexe 2

Renseignements complémentaires à la publication « Surface area of carbon nanoparticles: a dose metric for a more realistic ecotoxicological assessment » (Mottier *et al.*, Nano Letters, 2016)

Supporting information:

Surface area of carbon nanoparticle: a dose-metric for a more realistic ecotoxicological assessment.

*Antoine MOTTIER [1,2], Florence MOUCHET [1,2], Christophe LAPLANCHE[1,2], Stéphanie CADARSI [1,2], Laura LAGIER [1,2], Jean-Charles ARNAULT [3], Hugues A. GIRARD [3], Verónica LEÓN [4], Ester VÁZQUEZ [4], Cyril SARRIEU[5,6], Éric PINELLI [1,2], Laury GAUTHIER [1,2] and Emmanuel FLAHAUT [5,6] **

[1]ECOLAB, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, France

[2]ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[3]CEA LIST, Diamond Sensors Laboratory, F-91191 Gif sur Yvette, France

[4]Universidad de Castilla-La Mancha, Departamento da Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Avda. Camilo José Cela, 10 – 13071 Ciudad Real, Spain

[5]Université de Toulouse, INP, UPS, Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), UMR CNRS 5085, F-31062 Toulouse cedex 9, France

[6]CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France

Corresponding Author

*E-mail: flahaut@chimie.ups-tlse.fr

Materials and methods

1. Nanoparticles (C-NPs) features

Apart from MWCNTs which were from an industrial source, all other nanoparticles were provided by co-authors laboratories.

As described earlier, the DWCNTs were produced by catalytic chemical vapor deposition (CCVD) of a H_2-CH_4 mixture at 1000°C with CoMo-MgO catalyst [1]. CNTs are free from amorphous carbon coating. During the extraction process, oxides (unreacted CoMo-MgO) and unprotected metal nanoparticles (Co, Mo) were dissolved by addition of aqueous HCl solution. The acidic suspension was then filtered on 0.45 μm pore-sized polypropylene membranes (Whatman) and washed with deionized water until neutrality.

MWCNT were also produced by a CCVD process, but starting from a Fe-Al_2O_3 catalytic powder. They were provided by ARKEMA France (Graphistrength®) and used as received (no catalyst elimination).

Nano diamonds were synthesized by a milling process of macroscopic crystallites by Van Moppes (Syndia SYP 0-0.02: ND-20 nm) [2].

Concerning the tested FLG, it was obtained by ball milling at University Castilla-La Mancha [3,4]. In a typical procedure, 7.5 mg of graphite and 0.16 mmol of melamine were ball-milled at 100 rpm during 30 min under air atmosphere. After the milling treatment, the resulting solid

mixtures were dispersed in 20 mL of water to produce black suspensions. The as-prepared dispersions were filtered and washed with hot water to remove melamine. After letting the solutions rest for 5 days, the precipitate was removed, and the resulting dispersions in water were stable at room temperature within weeks. Larger concentrations were produced by combining the required number of separate batches.

The morphologic features of each kind of C-NPs were investigated by BET and by length measurements from TEM images (cf. Figure 1 in manuscript). These data are gathered in the table S1 and size histograms are displayed in figure S1. Considering DWCNTs, MWCNTs, NDs and FLG, a wide range of specific surface area was involved (respectively 980, 240, 210 and 10 $m^2.g^{-1}$ with an experimental ± 10% accuracy). DWCNTs mainly consist of double wall nanotubes (80%) with a 2.05 nm median outer diameter. MWCNTs have between 5 and 15 walls according to the supplier, which was confirmed by our own observations, and the mean outer diameter was 5.7 nm. Both nanotube batches contained in addition some disorganized carbon species which were agglomerated with the nanotubes, as well as some remaining catalytic nanoparticles (metals encapsulated in carbon layers for both CNTs, Fe-Al_2O_3 particles for MWCNTs). DWCNTs were organized in bundles of small diameter. MWCNTs, due to their less linear morphology, were more isolated and did not form any kind of organized bundle (maximum: a few tens of nanometers) however, they were initially strongly agglomerated in large pellets up to a few mm. NDs had a variable shape and a diameter which corresponded to a mean value of 25 nm. FLG particles had also a shape difficult to describe. A mean length and a mean width could however be measured, which were respectively of 2.0 µm and 1.1 µm. HRTEM observations revealed the presence of particles with a number of layers between at least 5 and at least 24.

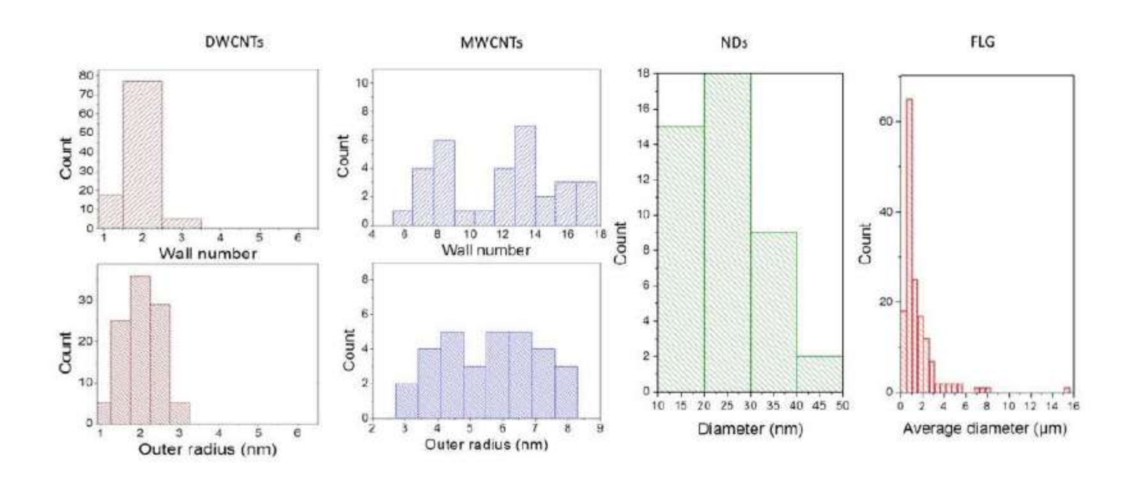


Figure S1: Histograms of measured characteristics of the particles from TEM micrography. Wall number and the outer radius of DWCNTs and MWCNTs. NDs and FLG diameters.

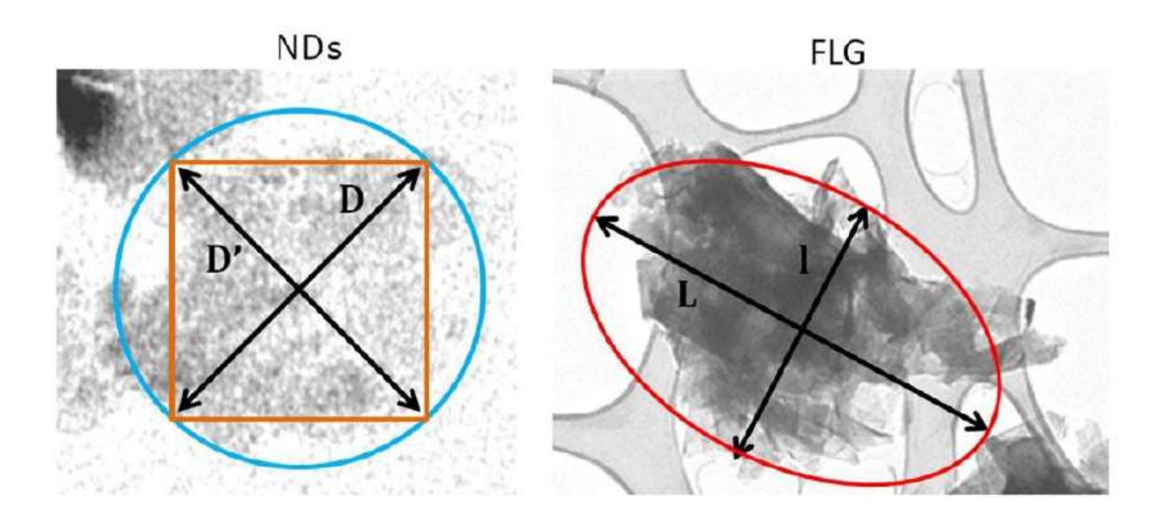


Figure S2: Method of assessment of a representative dimension for each particle of NDs and of FLG. In the case of NDs, the diagonal D and D' of an imaginary cube were looking for. The mean of D and D' was then used in order to calculate the volume of an equivalent cube (in orange here), and of an equivalent sphere (in blue). Concerning FLG, the largest diameter L and the perpendicular one l were estimated. The surface area of an equivalent ellipse (in red here) was then calculated from these values.

Particles dispersion and contamination method (exposure media)

For each studied concentration, the required amount of nanoparticles material was first dispersed in 20 mL of deionized water to prepare a stock suspension which was then equally stored in 12 test tubes, one per exposure day. The stock suspension was dispersed using suitable mechanical methods: except for FLG, suspensions were first dispersed by shear mixing with a homogenizer (SILVERSON L5M) at 8000 RPM, and then they underwent a pulsed sonication of 30 min (Vibra-Cell 75042 - 500 W - 3s on/3s off) with a probe of 1 cm of diameter at 30 % amplitude. In order to prevent a modification of the FLG sample, the stock suspension was in this case dispersed in milder conditions using an ultrasonic bath during 30 min (USC300T, VWR, 45 kHz, 80W). Following this homogenization step, appropriate amounts (depending on the final target mass concentration) were sampled with a micropipette under ultrasonic bath and introduced in individual test tubes. They were then leveled to 20 mL. Finally, just before the larvae exposure, all the 20 mL samples underwent again a short (2 min) sonication using an ultrasonic bath for 2 min (Bioblock 89863, typ 570 HF Freq 35 kHz). The suspensions were then poured in crystallizing dishes where larvae underwent the exposure. A second 2 min sonication bath treatment with additional 10 mL reconstitued water was performed in order to collect remaining material remaining on the tubes walls. Reconstituted water was then added to obtain a full exposure volume of 2L.

Calculation of the particle numbers and of the total surface:

In this study, the exposure effects were considered as a function of the usual mass concentration (M in mg.L^{-1}), but also as a function of the number of particles per liter (N_T in number.L^{-1}) and of the total surface area per liter (S_T in m².L^{-1}).

The surface area concentration was obtained from BET (Brunauer–Emmett–Teller, N_2 adsorption) data. The amount of N_2 required to condensate a monolayer on the sample at liquid-nitrogen temperature was measured experimentally and can be used, knowing the theoretical surface area occupied by a single nitrogen molecule, to determine the total surface area accessible to N_2 gas at liquid nitrogen temperature. Data are usually expressed as the specific surface area (SSA), in m².g^{-1}. The total surface area concentration was thus obtained by multiplying this value by the mass concentration used for the considered exposure.

$$S_T = SSA \times M$$

The measured experimental SSA of DWCNTs, MWCNTs, NDs and FLG, were respectively 980, 240, 210 and 10 m^2.g^{-1}.

The number of particles per liter was calculated using simple geometrical hypotheses, specific to each kind of nanoparticle, and not considering aggregation/agglomeration. Starting from size measurements by TEM observations, the average mass of each kind of particle (M_{1p}) was calculated, and then the mass concentration was divided by this value. An interval is proposed here for each value, considering the main uncertainties on the characterization values.

$$N_T = \frac{M}{M_{1p}}$$

In the case of nano diamonds, the observed shape of crystals was complex, intermediate between a cube and a sphere. Thus, both hypotheses were used to estimate an interval for the mean volume value, starting from the size distribution measurements. As described on fig S2, two dimensions were measured per particle on TEM images, the mean of both values was then used to calculate the volume of each particle. In the first case, this value D was used as a sphere diameter and in the second one, as a diagonal of a face of the cube. Thus the sphere radius is $r = \frac{D}{2}$ and the edge of the cube is $a = \frac{\sqrt{2}}{2}D = \sqrt{2}r$. The mass m_{1p} is obtained multiplying the volume by the theoretical diamond density $\rho_d = 350kg.m^{-3}$.

$$m_{1p}(ND_{sph}) = \rho_d 4\pi r^3 \qquad , \qquad m_{1p}(ND_{cub}) = \rho_d 2\sqrt{2}r^3$$

In this way, it was found that the mean mass $M_{1p} = \overline{m_{1p}}$ was between $2.6 \times 10^{-17}g$ (cube hypothesis) and $3.9 \times 10^{-17}g$ (sphere hypothesis), which corresponds to a 27.4 nm equivalent size. It was considered that the most probable value was near from the mean of the results obtained with both models. The assessed number of ND for 1 mg is around $3.3 \times 10^{13} \pm 20\%$. It should be noted that the uncertainty introduce by this method of calculation is here independent of the dimension r.

Thus, because of the complex particle shape, a ± 10 % uncertainty for the r measurement was moreover considered on the m_{1p} estimation. This corresponds to a possible error of $\pm$1nm on the particle equivalent size. The confidence interval for the number of particles is thus 30 %, the addition of the measurement incertitude and of the one coming from the calculation.

For FLG and CNTs, mass calculations are based on the model which was previously described [5]. It considers these particles are as an assembly of several rolled graphene sheets.

The surface area of all the sheets present in one particle is assessed by geometrical considerations, and then its mass is calculated using the theoretical surface density of graphene. In fact, graphene is a hexagonal arrangement of carbon atoms and each elemental hexagon is composed of 2 carbons and has a 5.246×10-20 m^2 surface area. Thus the specific surface area of one side of a graphene sheet (SSA_{1side}) is 1315 $m^2.g^{-1}$ and the theoretical surface density is $\rho_s = \frac{1}{SSA_{1side}} = 7.6 \times 10^{-4} g.m^{-2}$. [6]

It was supposed that FLG particles have an elliptic shape (which was found preferable to rectangular shape, less accurate). The individual mass was then obtained by multiplying the average surface area by the number of layers n_l.

$$M_{1p}(FLG) = \frac{\pi r_a r_b}{SSA_{1side}} \times n_l$$

The surface area of each FLG was estimated from TEM images using this hypothesis and measuring the largest and smallest widths of the particles, respectively r_a and r_b. A mean area of 3.99 μm^2 was determined, which is equivalent to disks with a 2.25 µm diameter. The number of layers was the most difficult feature to determine. HRTEM observations revealed that it could vary between roughly 5 and 30, and 18 was chosen as a most probable value. In this way, $M_{1p}(FLG)$ is between $1.52 \times 10^{-14} g$ and $9.10 \times 10^{-14} g$. With these hypotheses, the number of FLG particles in 1mg is about 2×10^{10} for 18 layers and is between -45% and + 230 % of this value when taking into account the real mean layer number which is closer to 30 or 5, respectively.

MWCNTs can be described as rolled up graphene sheets. Thus, as in the case of the DWCNTs, the mass of a single particle is the sum of the surface area of all the assembled

cylinders multiplied by the graphene surface density $\rho_{s=\frac{1}{SSA_{1side}}}$, considering that each wall inside the external one has a smaller radius and that the mean distance between two consecutive walls is $d_{ss} = 0.34nm$.

$$M_{1p}(MWCNT) = \frac{2\pi l}{SSA_{1side}}(r_{ext} + (r_{ext} - d_{ss}) + (r_{ext} - 2d_{ss}) + \cdots)$$
$$= \frac{2\pi l}{SSA_{1side}}\left(n_w r_{ext} - d_{ss}\sum_{i=1}^{n_w-1} i\right)$$

The mean outer diameter r_{ext} and the mean wall number n_w were estimated from HRTEM images. Thus DWCNTs and MWCNTs have respectively 1.03 and 5.67 nm external radius. It was not possible to determine the nanotube length in such samples, due to the formation of bundles and thus to the difficulty to identify individual carbon nanotubes. For this reason, a large variation interval between 1 and 10 µm was considered for this value l, where 5 µm was chosen as the most probable value. As a consequence, for 1µm nanotubes, the model gives a $M_{1p}(CNT_{1\mu m})$ mass which is 4.97×10^{-18} g and 1.84×10^{-16} g for DWCNTs and MWCNTs respectively. Thus the most probable number of nanotubes is 4×10^{13} for DWCNTs and 1.1×10^{13} for MWCNTs, but this could be -50 % lower or 400 % higher depending on the real length (1-10 µm).

These calculated numbers of particles are summarized in table S2 for 1 mg of material. The relevance of these models was estimated calculating the corresponding surface area concentrations using the same hypothesis and comparing the results with the ones which were obtained from experimental BET measurements. Additional hypothesis were however needed

in order to provide an interval for the values. Here the theoretical surface area concentration were calculated by multiplying the nanoparticle concentration by the mean external area S_{1p}:

$$S_{T-theo} = N_T \times S_{1p} = \frac{M}{M_{1p}} \times S_{1p}$$

In the case of carbon nanotubes, this expression is not depending on the tube length and is weakly depending on r_{ext}. Thus it was supposed, considering the distribution, that n_w was most likely comprised between 8 and 12 walls for the MWCNTs and that r_{ext} remaining the same regardless the number of walls.

$$S_{1p}(CNT) = 2\pi l r_{ext}\ , \qquad S_{T-theo}(CNT) = M \frac{SSA_{1side}}{n_w - \frac{d_{ss}}{r_{ext}} \sum_{i=1}^{n_w-1} i}$$

As for FLG, the total surface is not depending on surface dimension of particles, but the main uncertainty is the number of layers.

$$S_{1p}(FLG) = 2 \times \pi r_a r_b\ , \qquad S_{T-theo}(FLG) = M \frac{2SSA_{1side}}{n_l}$$

For ND, the results strongly depend on the ratio area/volume and thus on the shape chosen to describe particles. The accuracy on the radius estimation can be neglected here because it only has a 2% impact of the S_{T-theo} value.

$$S_{1p}(ND_{sph}) = 4\pi r^2\ , \qquad (ND_{sph}) = \frac{M}{\rho}\frac{3}{r},$$

$$S_{1p}(ND_{cub}) = 12r^2\ , \qquad S_{T-theo}(ND_{cub}) = \frac{M}{\rho}\frac{3\sqrt{2}}{r}$$

The calculated total surfaces of particles in 1 mg are given in table S3. With the most probable value, the error on the calculated total surface with reference to the ones obtained from BET measurements are 33% for DWCNTs, -17% for MWCNTs, -67% for NDs and 60% for FLG. Thus the defined models are in rather good agreement and suitable to propose correct orders of magnitudes for the estimation of the number of particles and for the corresponding total surface, in particular for carbon nanotubes. However, the error can be higher when the number of layer of FLG increases. A choice of 5 layers instead of 18 leads here to an overestimation of 430 % of the total surface for instance. In the case of NDs, the cube model is more suitable than the sphere one, but the surface is weekly underestimated in both cases (the error is 73 and 67 % respectively).

Table S1

Comparison of physical and chemical characteristics of the C-NPs

	DWCNTs	**MWCNTs**	**NDs**	**FLG**
Synthesis/ production	CCVD	CCVD	Milling process of macroscopic HPHT diamonds	Ball mining
Catalyst	Co/Mo-MgO	Fe-Al_2O_3	None	None
Carbon content (wt.%)	92 (5% Co, Mo)	90 (≤ 7% Al_2O_3) (≤ 5% Fe_2O_3)	99,5 (O, N<0.5%)	95 (5% O)
Number of walls/layers (from HRTEM)	80% DWCNTs, 15% SWCNTs, 5% TWCNTs	length: 1-10 μm diameter: 5-18 (average=10)	(not appropriate)	5-30
Size	1 to >100 %m in bundles (length), 1-3 nm (diameter) (from TEM)	length: 1-10 μm, diameter: 10-15 (from TEM)	25 nm (average diameter from TEM) [21 nm from DLS]	2.25 μm (average, from TEM)
Experimental specific surface area ($m^2\ g^{-1}$) (from BET)	980	240	210	10

CCVD: Chemical Catalytic Vapor Deposition, HPHT: High Pressure High Temperature, GANF: Grupo Antolin Carbon Nanofibers, NA: Not Available.

Double Walled Carbon NanoTubes (DWCNTs), Multi Walled Carbon NanoTubes (MWCNTs), Few layer graphene (FLG), Nano Diamonds (NDs).

Table S2: Comparison of number of particles results

Calculation assumption	Assembled cylinders: 2 walls $\rho_s = 7.68 \times 10^{-4}$ g.m^2 d_{ss}=0.34 nm (distance between the walls) Length: 1-10 µm	Assembled cylinders 10 walls $\rho_s = 7.68 \times 10^{-4}$ g.m^2 d_{ss}=0.34 nm (distance between the walls) Length: 1-10 µm	The volume is an intermediate value between the one of equivalent sphere and the one of the equivalent cube.	planar ellipsis 5-30 layers $\rho_s = 7.68 \times 10^{-4}$ g.m^2 (for 1 layer)
Data used for calculations	r_{ext}= 1.03 nm	r_{ext}= 5.67 nm	Mean volume = 0.7-1.1 x10^{-23} m^3 (cube-sphere calculation)	Mean surface area = 3.99 µm^2
Number of particles for 1 mg	2.0-20 x10^{13} $\Delta N/N = 164$	5.5-55 x10^{11} $\Delta N/N = 164$	2.7-3.9 x10^{13} $\Delta N/N = 36$ (Relative difference to the mean value of the interval)	1.1-6.6 x10^{10} $\Delta N/N = 142$

Double Walled Carbon NanoTubes (DWCNTs), Multi Walled Carbon NanoTubes (MWCNTs), Few layer graphene (FLG), Nano Diamonds (NDs)

Table S3 Comparison of total surface calculated results

Surface calculations	**DWCNTs**	**MWCNTs**	**NDs**	**FLG**
Total surface for 1 mg from BET	0.98 m^2	2.4x10^{-1} m^2	2.1x10^{-1} m^2	1x10^{-2} m^2
Calculation assumptions	1.5-2.5 walls r_{ext}= 1.03 nm	8-12 walls r_{ext}= 5.67 nm	Cube-Sphere	5-30 layers
Total surface for 1 mg from theoretical calculations	1.3-1.6 m^2 $\Delta S/S = 20$	1.8-2.2 x10^{-1} m^2 $\Delta S/S = 20$	0.6-0.8 x10^{-1} m^2 $\Delta S/S = 30$	0.9-5.3 x10^{-2} m^2 $\Delta S/S = 143$
Relative difference between BET and theoretical calculation	32.7%	-17.5%	-66.9%	-60.0%

Hierarchical Bayesian modelling of errors-in-variables regression

For clarity the model is presented in 5 sections: (1) Bayesian expression of the statistical model which was presented in the main document, (2) quantification of the prediction error, (3) errors-in-variables regression, (4) Bayesian computations, and (5) results.

(1) Non linear regression with heteroscedasticity

Predicted and observed sizes $E(Size_{ijk})$ and $Size_{ijk}$ are defined in the main document. Modeled residual variance σ_{jk}^2 were set proportional to their respective observations, $\sigma_{jk}^2=(\beta_i\ \sigma^{meas}_{jk})^2$, where σ^{meas}_{jk} are observed within-treatment measurement error variances (gathered from Table 3). Model unknown (α_i, β_i, and $EC50_i$) were assigned vague priors: α_i ~ Uniform(0,100), β_i ~ Uniform(0,100), and $\log_{10}(EC50_i)$ ~ Uniform($\log_{10}(EC50_i^{min})$, $\log_{10}(EC50_i^{max})$). The observed range of the dose metrics (Figure 2) was used to define the range of their respective EC_{50}, as provided below.

	$\log_{10}(x_i^{min})$	$\log_{10}(x_i^{max})$
Mass (i=1)	-3	3
Number (i=2)	6	18
Area (i=3)	-5	3

The model is, at this stage, the HBM expression of the statistical model which was presented in the main document. It accounts for errors in y-axis variables with heteroscedasticity and is referred as Model Y.

(2) Prediction errors

Let $\log_{10}(x_{ih})$ be equally-spaced values on a log scale for metric i (in the range $(\log_{10}(x_i^{min}),\log_{10}(x_i^{max}))$) and h be and index over those values. The predicted value for size at dose x_{ih} is

$$E(\text{Size}_{ih}) = \frac{100}{1 + \left(\frac{x_{ih}}{\text{EC50}_i}\right)^{\frac{1}{\alpha_i}}}$$

See implementation details later below for the use of the HBM to compute 95% CI on predicted sizes.

(3) Errors-in-variables regression

The model is updated in order to account for errors on both x- and y- variables (referred as model XY). Variable x_{ijk}, which denoted the measurement in Model Y, now denotes the prediction (Model XY) of the dose value using metrics i. Errors in the measurement of dose metrics are multiplicative and are consequently modeled as lognormal

$x^{meas}_{ijk} \sim \text{Lognormal}(\log(x_{ijk}),\sigma x_{ijk}^2)$,

where x^{meas}_{ijk} is the measured value for dose metric i for NP j at concentration k. As done for errors on y-axis variables, modeled residual variance σx_{ijk}^2 were set proportional to their respective observations, $\sigma x_{ijk}^2=(\beta_i \ \sigma x^{meas}_{ijk})^2$, where σx^{meas}_{ijk} are the measurement error variances for dose metric i. Proportionality coefficient β_i is the same for both x- and y-variables in order to account for errors in both with equal weights.

(4) Implementation

Both HBMs are too complex for posterior summary statistics to be analytically tractable; however, samples from the posterior distribution of latent variables can be simulated via Markov chain Monte Carlo (MCMC). For this, we used OpenBUGS. BUGS code for model XY is provided below.

```
model XY{
  for(iu in 1:4){ # metric
    for(ip in 1:4){ # nanoparticle
      for(ic in 1:4){ # dose
        xpred_log10[iu,ip,ic] ~ dunif(xmin_log10[iu],xmax_log10[iu])
        xpred_log[iu,ip,ic] <- xpred_log10[iu,ip,ic]*log(10)
        ypred[iu,ip,ic] <- 100/(1+pow(10,(xpred_log10[iu,ip,ic]-
EC50_log10[iu])/alpha[iu]))
        ymes[iu,ip,ic] ~ dnorm(ypred[iu,ip,ic],piy[iu,ip,ic])
        piy[iu,ip,ic] <- 1/pow(beta[iu]*sigmay[iu,ip,ic],2)
        xmes[iu,ip,ic] ~ dlnorm(xpred_log[iu,ip,ic],pix[iu,ip,ic])
        pix[iu,ip,ic] <- 1/pow(beta[iu]*sigmax[iu,ip,ic],2)
      }
    }
    for(i in 1:n){
      Y[iu,i] <- 100/(1+pow(10,(X_log10[iu,i]-EC50_log10[iu])/alpha[iu]))
```

```
    }
    alpha[iu] ~ dunif(0,100)
    EC50_log10[iu] ~ dunif(xmin_log10[iu],xmax_log10[iu])
    beta[iu] ~ dunif(0,100)
  }
}
```

Model XY reduces into Model Y by forcing σx^meas _ijk=0 for all i, j, k. Code for model Y is obtained from _XY's by removing variables xpred_log, xmes, and pix and by updating xpred_log10[iu,ip,ic]←log10(xmes[iu,ip,ic])

(5) Results

	Model Y			Model XY		
	$\log_{10}(EC50_i)$	α_i	β_i	$\log_{10}(EC50_i)$	α_i	β_i
Mass	1.57(1.21, 2.60)	1.2(0.23,4.8)	6.7(4.3,10.8)	1.53(1.21, 2.4)	0.99(0.20,3.9)	6.1(4.0,9.9)
Number	14.71(13.84,15.80)	3.3(1.28,7.9)	7.1(4.8,10.9)	14.88(14.35,15.30)	1.60(0.53,3.4)	4.3(2.9,6.8)
Area	0.87(0.67, 1.1)	1.0(0.57,1.7)	3.8(2.6, 5.8)	0.87(0.66, 1.1)	1.00(0.55,1.6)	3.6(2.7,5.1)

Convergence was reached in less than 100 iterations and 10,000 additional MCMC samples were simulated in order to produce the following results. Confidence interval on size predictions using Model Y are plotted in Figure S3. Estimates (together with 95% CI) of model parameters using both Models Y and XY are provided below.

Confidence intervals for α_i using the Mass or Number metrics are larger than those when using the Area metric. This explains why CI for predicted size are narrower and fit is better using Area as a predictor (Figure 2). Estimates for $\log_{10}(EC50_i)$ and α_i are unchanged by using Models Y and XY for Mass and Area metrics. Estimates are on the other hand slightly

different for the Number metric; due the high uncertainty on the measurement of the x-variable in this case. Regression plots using Model XY are provided below (Figure S3). As a conclusion, errors in x-variables should be considered when fitting a regression model with the Number metric. Results are virtually unchanged when using the Area metric.

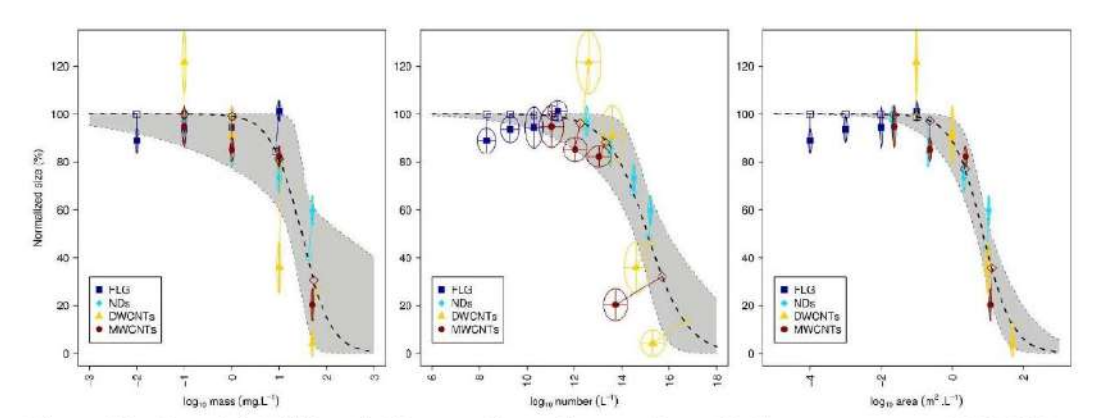


Figure S3: Growth inhibition in *Xenopus laevis* larvae after a 12-days exposure to FLG, NDs, DWCNTs, and MWCNTs. Normalized size (%) is plotted vs. the log_{10} of three different metrics: mass concentration (mg.L^{-1}), number of particle concentration (L^{-1}) and surface concentration (m².L^{-1}). Black dashed lines represent nonlinear regression model predictions and shaded areas are 95% CIs on these. 95 % CIs on mean sizes which were computed from the experimental assays are represented as vertical error bars. Ellipses represent 95% CI on measured values; respective predictions are also represented.

Supplementary information references:

(1) Flahaut, E.; Bacsa, R.; Peigney, A.; Laurent, C. *Chem. Commun.* **2003**, 1442–1443.

(2) Paget, V.; Sergent, J. A.; Grall, R.; Altmeyer-Morel, S.; Girard, H. A.; Petit, T.; Gesset, C.; Mermoux, M.; Bergonzo, P.; Arnault, J. C.; Chevillard, S. *Nanotoxicology* **2013**, *8*, 46–56.

(3) León, V.; Quintana, M.; Herrero, M. A.; Fierro, J. L. G.; Hoz, A. D. La; Prato, M.; Vázquez, E. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10936–10938.

(4) León, V.; Rodriguez, A. M.; Prieto, P.; Prato, M.; Vázquez, E. *ACS Nano* **2014**, *8*, 563–571.

(5) Peigney, A.; Laurent, C.; Flahaut, E.; Bacsa, R. R.; Rousset, A. *Carbon N. Y.* **2001**, *39*, 507–514.

(6) Laurent, C.; Flahaut, E.; Peigney, A. *Carbon N. Y.* **2010**, *48*, 2994–2996.

Annexe 3

Normalisation des résultats de génotoxicité et expression en fonction de la surface des nanoparticules carbonées

Les résultats de génotoxicité ont été présentés dans ce manuscrit sous forme « brute », c'est-à-dire sans modification particulière suite au dénombrement des érythrocytes comportant des micronoyaux (EMN ‰). De cette façon, la comparaison de chaque condition testée par rapport au témoin négatif a pu se faire, de façon statistique, au sein d'une même expérience (chaque expérience correspondant à une NPC donnée). Néanmoins, comparer l'effet de différentes NPC chez le xénope sur la base de ces valeurs « brutes » et conclure sur la plus grande dangerosité de l'une ou de l'autre n'est pas possible (sauf dans le cas de témoins communs aux expériences[1]). Pour permettre cette comparaison, cette annexe propose une normalisation des données de génotoxicité. Reposant sur cette normalisation, les données de génotoxicité seront dans un second temps exprimées en fonction de la masse et de la surface des NPC.

Il est possible de normaliser des données par rapport au témoin négatif (c'est ce que nous avions fait pour la croissance au Chapitre 3). Mais dans le cas du nombre d'érythrocytes micronucléés, cela ne suffirait pas à exprimer la sensibilité de chaque ponte. En effet, si les données étaient normalisées par le seul témoin négatif, le témoin positif resterait quant à lui hautement variable d'une expérience (ou ponte) à l'autre, alors que le composé et la dose d'exposition resteraient les mêmes (20 $mg.L^{-1}$ de cyclophosphamide). Une normalisation par les deux témoins simultanément est donc ici proposée. Au final, le calcul revient à normaliser par l'écart séparant les deux témoins, comme indiqué dans la formule ci-dessous :

$$Génotoxicité\ normalisée\ (\%) = \left(\frac{EMN_{indiv} - EMN_{T-}}{EMN_{T+} - EMN_{T-}}\right) \times 100$$

Avec EMN_{indiv} le nombre d'érythrocytes micronucléés (EMN ‰) d'un individu, EMN_{T-} la médiane du nombre d'érythrocytes micronucléés du témoin négatif, et EMN_{T+} la médiane du nombre d'érythrocytes micronucléés du témoin positif. Une valeur normalisée, exprimée en pourcentage, est ainsi obtenue pour chaque individu. La médiane de ces valeurs normalisées est

[1] Dans notre étude, seuls les rGO200, rGO1000 et MW-Décano d'une part, et les DW-SRNOM et GO-B d'autre part, ont eu des témoins positifs et négatifs communs, les expériences ayant été menées simultanément dans les mêmes conditions.

alors calculée pour chaque condition testée. Les résultats obtenus sont représentés par la Figure A.1.

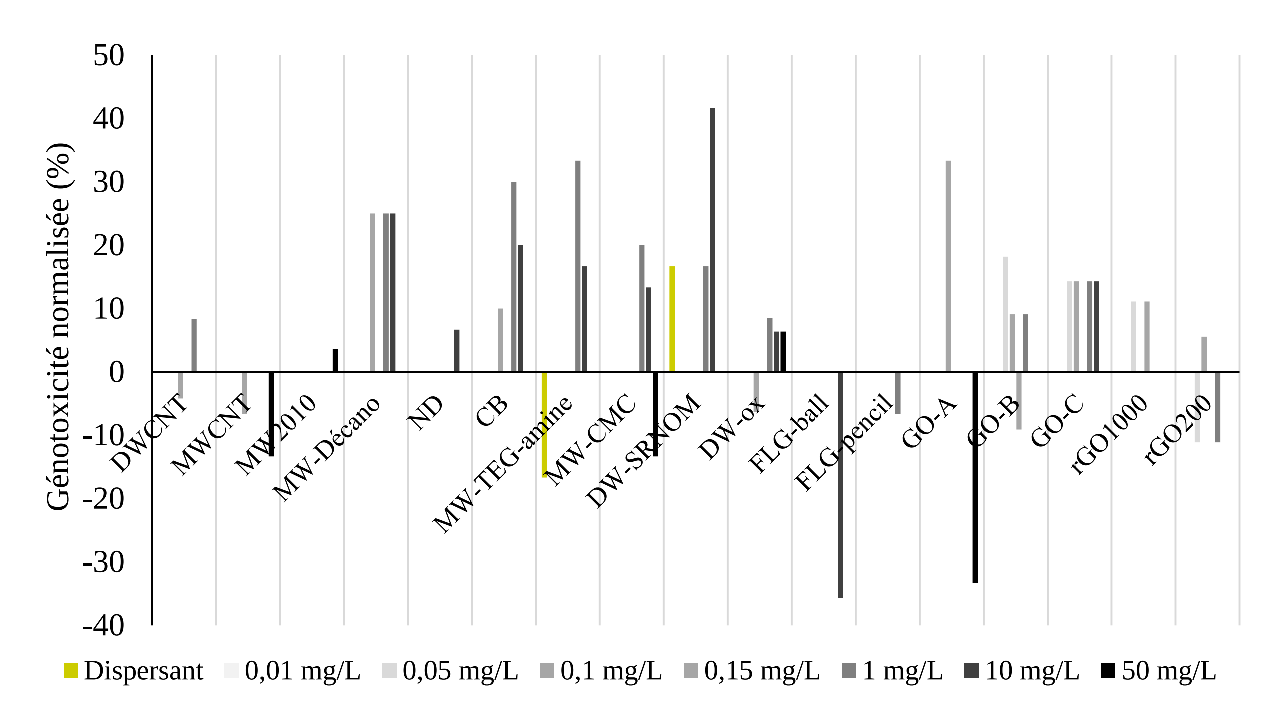


Figure A.1. Génotoxicité normalisée de différentes nanoparticules de carbone (et des dispersants chimiques utilisés, le cas échéant) chez *X. laevis* après 12 jours d'exposition en conditions normalisées. Les témoins négatifs (génotoxicité = 0%) et positifs (génotoxicité = 100%) ne sont pas représentés. Les intervalles de confiance n'ont pas été représentés par soucis de lisibilité.

D'après ces données relatives, la comparaison des résultats peut se faire sous un nouvel angle, mettant en évidence différents niveaux de génotoxicité. Ainsi, il semblerait que les NPC les plus génotoxiques soient les DW-SRNOM, suivis du GO-A et des MW-TEG-amine, puis du CB. Néanmoins, la génotoxicité des DW-SRNOM et du CB se manifeste surtout à forte dose, tandis que celle du GO-A intervient à faible dose. Quel que soit le GO (GO-A, GO-B ou GO-C, selon leurs lots respectifs), l'induction de génotoxicité à faible dose est toujours bien mise en évidence. Les MW-Décano semblent également induire un fort taux de génotoxicité. Cependant, la valeur du témoin positif sur laquelle se base la normalisation est faible (4,5 ‰, alors que la valeur des autres témoins positifs est en moyenne de l'ordre de 10 ‰). Cela implique un pourcentage élevé de génotoxicité pour les xénopes exposés aux MW-Décano (alors que l'on ne compte que 2 EMN ‰ pour chaque concentration testée, ce qui n'est pas significativement du témoin négatif, à 1 ‰). Ceci souligne une limite de la normalisation utilisée, puisqu'en voulant gommer la sensibilité existante entre les pontes, la normalisation assimile un même niveau de sensibilité à chacune face aux différents contaminants. Or, les modes d'actions de ces derniers conduisant à l'effet génotoxique observé peuvent éventuellement varier. Cela demande à être vérifié, mais cette hypothèse pourrait aussi remettre

en question le choix du contrôle positif utilisé, dans le cadre d'une application du test normalisé aux nanoparticules de carbone (une nanoparticule nanocarbonée génotoxique serait idéale comme témoin positif). Avec l'exemple de l'expérience des MW-Décano, il se pourrait par exemple que la ponte de xénope ait été peu sensible au contrôle positif, mais plus sensible aux nanotubes multi-parois eux-mêmes. Au contraire, les xénopes exposés aux DW-ox semblent avoir été très sensibles au témoin positif (25 ‰) alors qu'ils l'ont visiblement moins été pour les DW-ox (3,5 ‰ à la concentration 1 $mg.L^{-1}$, significativement génotoxique au test de McGill), d'où une génotoxicité normalisée relativement faible (< 10%).

Par ailleurs, un certain nombre de conditions affichent des taux de génotoxicité inférieurs ou égaux à zéro (c'est-à-dire à des taux inférieurs ou égaux à celui du témoin négatif). A faible dose, de tels résultats pourraient éventuellement être interprétés comme des effets protecteurs. De tels phénomènes pourraient s'expliquer par une action antibactérienne des NPC concernés, sans pour autant atteindre des seuils toxiques pour les larves. A forte dose, les pourcentages de génotoxicité inférieurs ou égaux à zéro semblent davantage liés à l'inhibition des taux de mitoses érythrocytaires.

La normalisation des données de génotoxicité permet aussi de les représenter en fonction de différentes unités de concentration (en fonction de la masse ou de la surface des particules), comme nous allons maintenant le montrer. Les données précédentes sont ici reprises pour permettre une meilleure comparaison graphique. Notons que ne disposant pas des données de surface spécifique pour toutes les nanoparticules testées, seules sont présentées celles pour lesquelles le calcul de concentration en $m^2.L^{-1}$ a été possible. Le CB et le FLG-pencil, pour lesquels la surface spécifique ne constitue pas une donnée fiable (cf. Chapitre 3) sont ajoutés pour simple information. La comparaison graphique des données de génotoxicité exprimée en fonction de la masse ou de la surface des particules (Figure A.2) ne laisse apparaitre que des nuages de points, ce qui ne permet pas de mettre en évidence de tendance globale, dans un cas comme dans l'autre. Avant même de concevoir un modèle et de faire intervenir les critères statistiques de l'AIC et des R^2, la surface ne semble pas plus pertinente que la masse pour décrire les résultats de génotoxicité. C'est pourquoi il est choisi de les traiter dans ce manuscrit en conservant l'unité traditionnelle en $mg.L^{-1}$.

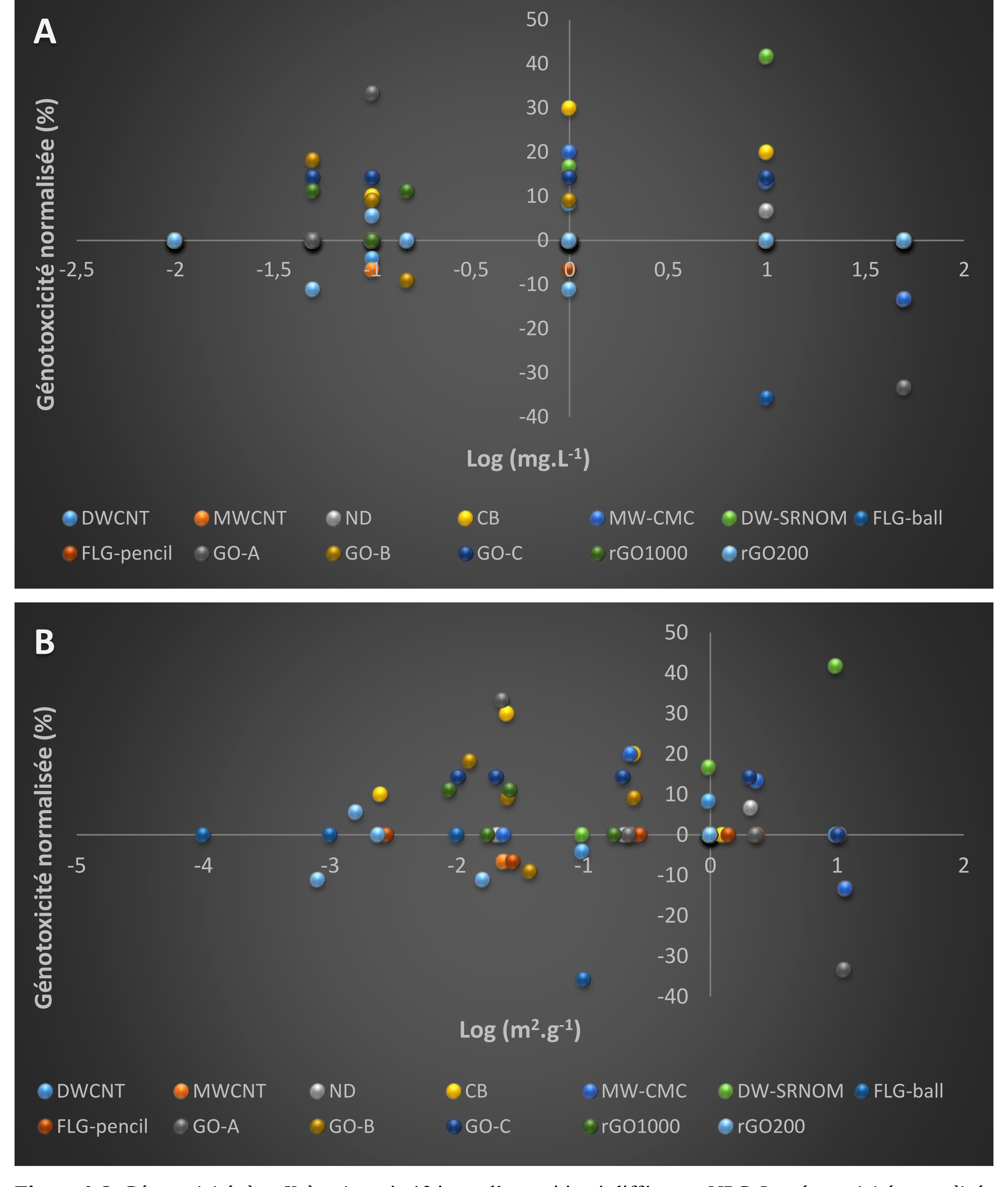


Figure A.2. Génotoxicité chez *X. laevis* après 12 jours d'exposition à différentes NPC. La génotoxicité normalisée est exprimée en fonction du logarithme en base 10 de la masse (A) ou de a surface des nanoparticules (B).

Annexe 4

Estimation du taux de filtration des xénopes exposés à l'oxyde de graphène (GO) à l'aide d'une mesure d'absorbance et d'une relation taille-masse

Cinétique de sédimentation de l'oxyde de graphène (GO) dans les milieux d'exposition

Afin de mieux définir l'exposition des larves de xénope au cours du renouvellement quotidien des milieux expérimentaux, le suivi de la sédimentation a été réalisé à travers l'exemple du GO. La concentration dans le milieu a été obtenue via la mesure de l'absorbance (lecteur de microplaque CLARIOstar®) sur 24 heures de cinétique (0 ; 10 min ; 30 min ; 1h ; 1h30 ; 2h ; 4h ; 8h ; 24h). Bien que la concentration de 0,1 mg.L^{-1} de GO aurait méritée d'être suivie - puisque c'est cette concentration qui induit de la génotoxicité chez *X. laevis*- le seuil de détection du lecteur de microplaque n'a pas permis de l'observer sur 24h. Ainsi, seule la concentration 10 mg.L^{-1} de GO a pu être suivie pour des raisons de seuil de détection. Cet exemple est illustré par la Figure A.1, où la sédimentation du GO dans le milieu d'exposition est étudiée en absence de nourriture (les particules de nourriture peuvent interférer avec la mesure d'absorbance ou bien elle-mêmes influencer la sédimentation du GO). Etudier la cinétique de sédimentation en présence de nourriture serait également intéressant pour compléter la caractérisation de la dispersion dans les conditions d'exposition. Néanmoins, ce ne sera pas l'objet ici, dans cette première approche.

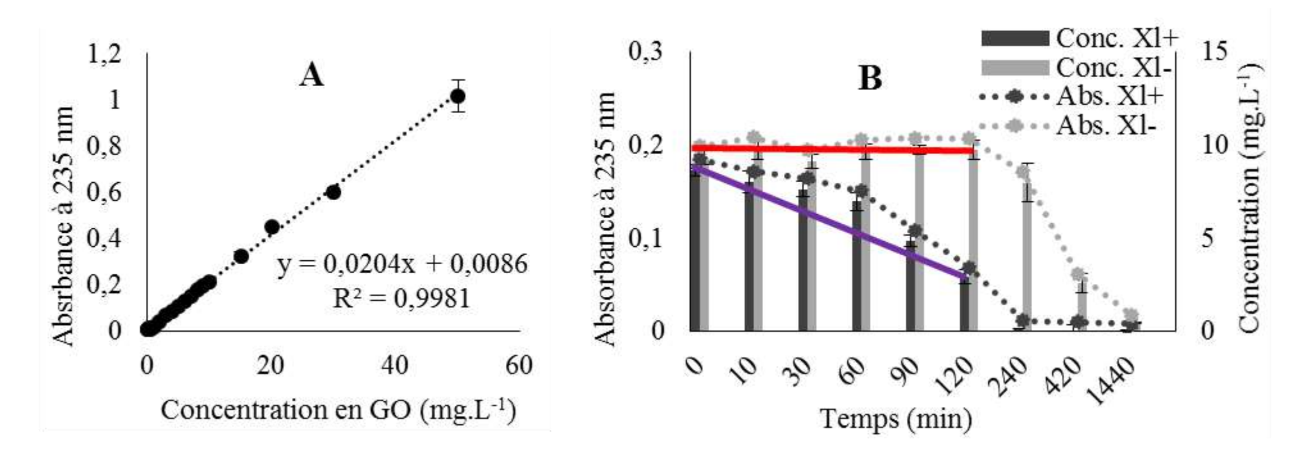


Figure A.1. Suivi de la concentration en GO dans la colonne d'eau des milieux d'exposition sur 24 heures. **A**: gamme étalon du GO à son maximum d'absorbance (235 nm) (3 réplicas), équation et coefficient de détermination de la fonction linéaire correspondante (pointillés). **B**: suivi de la concentration en GO (histogramme ; les pointillées correspondent à l'absorbance correspondante à 235 nm ; 3 réplicas) pendant 24 heures dans la colonne d'eau des milieux d'exposition en absence (gris clair) ou en présence de 20 larves de xénope (gris foncé). L'exemple est donné pour une concentration initiale de 10 mg.L^{-1} dans la colonne d'eau et en absence de nourriture. La droite

rouge indique la stabilité de la dispersion entre 0 et 2h en absence de xénope. La droite violette donne une approximation de la diminution de concentration de la colonne d'eau entre 0 et 2h par filtration des xénopes.

La Figure A.1 montre l'évolution de la concentration du GO dans la colonne d'eau en absence de xénope d'une part, et en présence de xénope (20 larves) d'autre part. Il apparait que seul dans le milieu, le GO sédimente jusqu'à ce que la colonne d'eau soit quaisment épurée au bout de 24h (le seuil de détection est atteint). Comme expliqué précédemment (Chapitre 4), les sels présents dans le milieu jouent en la faveur d'une accélération de cette sédimentation (par rapport à ce quelle serait dans l'eau pure). Par ailleurs, la présence des organismes a pour conséquence une sédimentation encore plus rapide du GO, puisque la concentration dans la colonne d'eau est proche de zéro dès 4h d'exposition. Le relargage d'ions et molécules biologiques par les larves dans le milieu, la sécrétion de mucus, mais surtout leur comportement filtreur peuvent expliquer cette accentation de sédimentation.

Relation taille-masse des larves de xénope en pro-métamorphose

En vue de calculer un taux de filtration des larves de xénope sur la base de leur masse (cf partie suivante de cette Annexe), une relation taille-masse a été établie (Figure A.2).

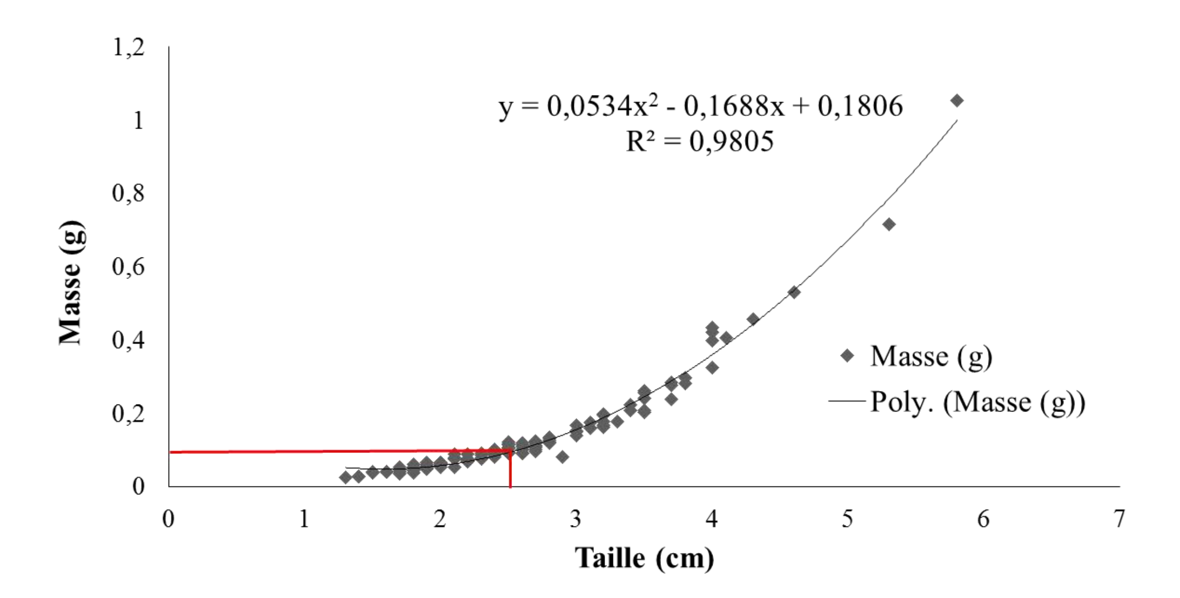


Figure A.2. Relation taille-masse réalisée à partir d'individus issus de pontes diverses (larves de *Xenopus laevis* de divers âges, en phase pro-métamorphique). La ligne rouge marque la taille moyenne des individus utilisés pour la mesure d'absorbance (Figure A.1), soit 2,65 cm, correspondant à une masse moyenne de 0,11 g d'après l'équation polynomiale.

Ici, des données de masse et de taille ont été collectées à partir de 120 larves non exposées aux nanoparticules, de pontes (différents reproducteurs, différentes saisons de pontes, différentes

conditions de nutrition et de température) et de stades distincts (avant métamorphose). Cette diversité a été volontairement choisie pour couvrir un maximum de situations différentes, et montrer qu'en dépit de tout cela, les résultats obtenus ne sont pas répartis aléatoirement mais suivent une même tendance, soulignant la « légitimité », ou la constance, de la relation établie. Profitant par la même occasion du surplus de larves non utilisées pour les expérimentations principales, celles-ci ont été anesthésiées (MS222) puis séchées par simple dépôt sur du papier absorbant pendant quelques secondes avant d'être mesurées sur papier millimétré puis pesées (X7 220A Precisa, précision 0,1 mg).

Cette relation taille-masse se veut être un outil facilitant l'obtention de la masse fraiche des individus à partir de la connaissance de leur taille. Effectivement, la masse des organismes est une donnée peu commode à obtenir en fin d'exposition, dès le moment où les paramètres expérimentaux à acquérir demandent une dissection immédiate et une extraction de certains tissus après anesthésie. De plus, les larves étant relativement sensibles aux manipulations au stade concerné, mesurer leur masse en cours d'expérimentation pourrait s'avérer délétère (ou pourrait fausser d'autres paramètres mesurés).

Estimation du taux de filtration des larves

En faisant abstraction des autres éléments biologiques susceptibles d'influencer la sédimentation du GO (ions, molécules biologiques, mucus, éventuelles variations de pH à l'échelle de la journée), le taux de filtration des larves dans le milieu peut être estimé grâce à la lecture d'absorbance.

Pour se faire, cette estimation se base sur les deux premières heures de contamination du milieu. La Figure A.1.B montre qu'en absence de xénope, la concentration de 10 $mg.L^{-1}$ est constante dans la colonne durant cette phase. En revanche, la présence de xénopes (20 individus, dans 2L de milieu) fait décroitre la concentration de 6 $mg.L^{-1}$ sur cette même durée de 2h (passant de 10 à 4 $mg.L^{-1}$). Ainsi, en 1h, 3 $mg.L^{-1}$ sont perdus dans la colonne d'eau. Compte tenu de la concentration initiale du milieu, cette perte correspond à un volume de 0,3L, soit 300mL. Ramenons à présent ce résultat par volume de milieu filtré par xénope :

Dans 1L de milieu, 300 mL/h sont filtrés par 10 xénopes

⇔ Soit 30 mL/h par xénope

A présent, exprimons ce résultat par gramme de xénope. La taille moyenne des individus utilisés pour la mesure d'absorbance est de 2,65 cm (ce qui correspond globalement à la taille des larves au bout de 4 ou 5 jours d'exposition en conditions normalisées). Grâce à la relation taille-masse établie (Figure A.2), nous pouvons obtenir la masse moyenne correspondante des individus, soit 0,11g.

30 mL/h ont donc été filtrés par xénope

⇔ Soit 30 mL/h pour 0,11g d'individu

⇔ Soit **272,7 mL/h/g**

Ainsi, nous pouvons estimer au bout de combien de temps tout le volume de la colonne d'eau aura été filtré. Si 272,7 mL sont filtrés par heure et par gramme de xénope, alors il faudra 3,67h pour filtrer 1000 mL (par gramme de xénope). Soit, pour 10 individus de 0,1g environ (⇔1g de xénope), dans 1L, 3 heures et 40 minutes.

En partant du postulat que le taux de filtration est le même quelle que soit la concentration (bien que ce soit discutable), il est également possible d'estimer le temps d'épuration de la colonne d'eau pour la concentration initiale de 0,1 $mg.L^{-1}$ de GO. Par exemple, si la taille moyenne des xénopes exposés à 0,1 $mg.L^{-1}$ de GO est de 4,6 cm (cas des xénopes en fin d'exposition utilisés pour l'étude de génotoxicité, Chapitre 4, partie 3), alors leur masse moyenne est de 0,53 g. Avec un taux de filtration de 272,7 mL/h/g, la filtration totale de la colonne d'eau dure théoriquement moins de 42 minutes avec 20 individus dans 2 L.

Néanmoins, cette estimation du taux de filtration ici présentée est encore au stade exploratoire, beaucoup d'éléments demandant à être évalués pour affiner le résultat. En premier lieu, comme la masse des xénopes évolue au cours du temps (sur 12 jours), la vitesse de filtration de la colonne d'eau augmente parallèlement. Le résultat obtenu est donc un instantané, et ne reflète pas parfaitement l'état de la dispersion sur la totalité de l'exposition (plus on avance dans le temps de l'expérience, plus vite la colonne d'eau est épurée et moins les xénopes restent en contact avec le GO). Cette approche est également limitée par ses postulats, puisque visuellement, le taux de pompage (et donc de filtration) des xénopes est variable en fonction de la concentration testée, bien qu'il n'ait pas encore été quantifié. Prédire le temps d'épuration de la colonne d'eau de diverses concentrations d'exposition est donc grandement approximé. De plus, la variabilité inter-ponte peut également donner lieu à des taux de filtrations variables. Cette variabilité biologique peut par exemple s'exprimer, en dépit des mêmes conditions

expérimentales, par de légères fluctuations physiologiques dépendantes du stade de développement (des xénopes de stade légèrement plus avancé pourraient éventuellement utiliser davantage leurs poumons au détriment de leurs branchies). De plus, les branchies étant doublement impliquées dans la respiration et dans la prise alimentaire, la présence de nourriture dans le milieu pourrait également modifier la fréquence de pompage des larves. Enfin, cette approche est ciblée sur le GO et ne pourrait être extrapolée à d'autres nanoparticles de dispersion différente pour prédire le temps d'épuration de la colonne d'eau.

Annexe 5

Comparaison de deux méthodes d'évaluation de la concentration en métaux dans l'oxyde de graphène (GO)

Durant sa synthèse, l'oxyde de graphène (GO) est confronté à différents catalyseurs impliquant des métaux : Fe, Co, Ni, Mn. Ainsi, des impuretés métalliques sont susceptibles de se retrouver sur le GO, c'est-à-dire à sa surface, voire entre ses feuillets de carbone, et cela même après différents procédés de purification. De telles impuretés pourraient jouer un rôle dans la toxicité du matériau, aussi évaluer leur concentration s'avère nécessaire. L'évaluation de la concentration en métaux de toute matrice (poudre de nanoparticules, sol, animal, végétal) passe par sa minéralisation. Ici, nous souhaitons réaliser une minéralisation totale du GO, pour connaitre sa concentration totale en métaux. Cette minéralisation totale est parfois difficile à atteindre selon la matrice, et requiert des protocoles bien particuliers. Les nanoparticules de carbone manufacturées ayant fait leur apparition relativement tard, très peu d'études se sont penchées sur une méthode de minéralisation spécifique. Néanmoins, le caractère réfractaire des matrices carbonées a déjà été rapporté.

Les intérêts sont multiples : doser les impuretés métalliques du GO ; valider une méthode de minéralisation efficace et utilisable en routine ; si des métaux sont retrouvés dans le GO en quantités suffisantes, ils pourront éventuellement servir, à terme, à tracer le GO dans l'organisme.

Cette annexe traite les deux premiers points évoqués. Son but est d'explorer la minéralisation du GO, à travers la comparaison de deux protocoles :

- <u>Méthode 1</u> : Micro-onde (Milestone UltraWAVE) sous conditions acides (d'après Ayouni-Derouiche *et al.*, 2014)
- <u>Méthode 2</u> : Séchage au four couplé à une digestion acide (méthode de Ge *et al.*, 2008, avec quelques modifications)

Dans les deux cas, le même matériau de référence a été utilisé : il s'agit d'un nanotube de carbone mono-paroi certifié (SWCNT-1, National Research Council Canada). Il subit le même traitement que les échantillons de GO. Le principe est le suivant : la composition théorique en métaux du matériau de référence est connue. La minéralisation du matériau de référence, suivie

de l'analyse par spectrométrie d'émission atomique (ou optique) couplée à plasma inductif (ICP-AES, ou ICP-OES), permettra d'obtenir sa concentration mesurée en métaux. Le rapport entre les deux valeurs (mesurée et théorique) renseigne alors sur le rendement de l'une ou l'autre méthode de minéralisation, et permet de définir celle des deux qui est la plus efficace. Le matériau de référence (SWCNT-1) étant choisi pour être aussi proche que possible de la matrice de l'échantillon à tester (GO) (ce qui sous-entend qu'il devrait réagir de la même façon aux conditions de minéralisation), son rendement pourra être assimilé à celui du GO.

Suite à la minéralisation des échantillons, ceux-ci sont analysés par ICP-AES (ou ICP-OES) (analyseur iCAP^{TM} 6300, Thermo Fisher Scientific) afin de doser leur contenu en métaux, ou cations majeurs. Le principe de la mesure (Figure A.1) repose tout d'abord sur l'introduction d'un échantillon liquide dans l'ICP et sur sa nébulisation, au cours de laquelle l'échantillon est converti en aérosol sous flux d'argon à haute pression. Puis, l'échantillon est exposé à un plasma d'argon à très haute température (>10 000 K) qui le divise en atomes. Une fois excités, ces atomes retournent à un niveau plus faible d'énergie en émettant des rayonnements spécifiques, dont la longueur d'onde est mesurée. Le type d'éléments et leur quantité (concentration) sont alors déterminés d'après la position des rayonnements photoniques et leur intensité.

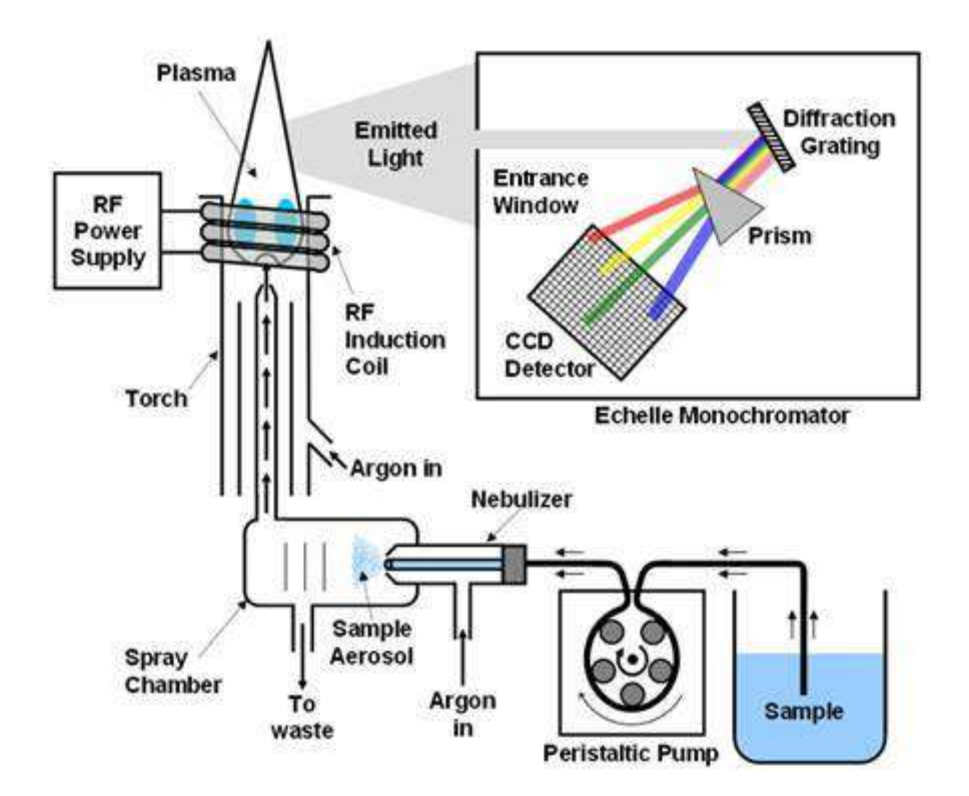


Figure A.1. principe de fonctionnement de l'ICP-AES (ou ICP-OES) (d'après Analytical Chemistry Lab Manual, n.d.)

Principe de la méthode 1 : Micro-onde (Milestone UltraWAVE) sous conditions acides

Cette première méthode de minéralisation a été réalisée par le laboratoire Crealins. Brièvement, elle consiste tout d'abord à peser les échantillons de GO sous forme de poudre (MX5 micro balance, Mettler Toledo). Des tubes en PTFE sont utilisés pour leur résistance chimique et thermique. La poudre de GO y est introduite, puis est ajouté un mélange (2 mL par milligramme de GO) d'acide nitrique et sulfurique (1:1) pendant 1h à la température maximale de 230°C, suivant le programme suivant : 15 minutes de rampe pour atteindre 150°C, suivies de 30 minutes de rampe pour atteindre 230°C et d'un plateau de 30 minutes à 230°C. La méthode est conçue pour être utilisée en routine en laboratoire, et présente l'avantage d'être efficace (rendement proche de 100% pour les nanotubes de carbone double paroi testés), rapide, et applicable sur de faibles quantités de nanomatériau (de l'ordre du milligramme). Elle est par contre relativement onéreuse.

Principe de la méthode 2 : Séchage au four couplé à une digestion acide

Un protocole simplifié de cette méthode, réalisé au laboratoire Ecolab, est ici présenté. Il s'agit dans un premier temps de faire subir différents traitements thermiques aux échantillons de poudre de GO, préalablement pesés (environ exactement 10 mg ; X7 220A Precisa, 0,1 mg de précision), en procédant par triplicas. Ainsi, les échantillons de poudre de GO sont soit laissés à température ambiante, soit soumis pendant 30 minutes à 350, 550, ou 750°C. Pour cela, les échantillons sont placés dans des creusets en céramique. Ils sont ensuite récupérés dans des DigiTubes préalablement pesés et référencés. Des DigiTubes supplémentaires sont utilisés pour servir de blanc de minéralisation et pour contenir le matériau de référence. Afin d'utiliser ce matériau avec parcimonie, seuls les traitements thermiques à température ambiante et à 750°C y ont été appliqués, sans faire de réplicas. Suite à ces différents traitements thermiques, tous les échantillons sont soumis aux mêmes conditions d'attaque acide. Pour cela, au fond de chaque DigiTube, quelques gouttes d'eau milliQ sont ajoutées à la poudre pour faciliter l'attaque acide. Puis, 2 mL de HNO_3 65% sont ajoutés et sont laissés agir toute la nuit (bouchon fermé). Le lendemain, les DigiTubes sont placés en l'état sur une plateforme chauffante (DigiPREP) à 80°C pendant 90 minutes. Les échantillons sont alors refroidis à température ambiante pour être dégazés (par simple ouverture du bouchon), avant d'ajouter 2 mL de H_2O_2 à 30%. Les tubes sont de nouveau chauffés à 80°C pendant 90 minutes. Les échantillons n'étant pas limpides

après cette étape (indiquant que la minéralisation totale n'est pas atteinte), il est choisi de les filtrer (filtres en PTFE, 0,45 µm, Dutscher), avant d'ajuster chaque tube à 10 mL avec de l'eau milliQ. Les tubes sont de nouveau pesés pour connaitre le facteur de dilution appliqué, et conservés à 4°C jusqu'à l'ICP. Cette méthode est moins onéreuse que la première et le laboratoire Ecolab dispose déjà de l'appareillage nécessaire pour la réaliser. Elle est par contre un peu plus longue que la première (d'autant que certaines étapes pourraient être répétées en vue d'une meilleure efficacité : attaque acide renouvelée, ou encore augmentation du temps de passage au four), même si elle peut être appliquée à une vingtaine d'échantillons simultanément. Elle semble néanmoins plus appropriée pour des quantités d'échantillons supérieures au milligramme (de l'ordre du gramme idéalement).

Comparaison des 2 méthodes :

Le rendement du matériau de référence (SWCNT-1) ainsi que les concentrations en cobalt, fer, manganèse et nickel présents dans le GO sont rapportées dans le Tableau A.1, selon la méthode de traitement utilisée. Même si la minéralisation totale n'est pas tout à fait atteinte, il apparait que la Méthode 1 présente une très bonne efficacité (rendement de 90,8 ± 5 %). Les concentrations en métaux du GO obtenues *via* cette méthode paraissent donc fiables. Beaucoup de Mn et de Ni sont retrouvés.

La Méthode 2 est également très efficace lors du traitement à 750°C (rendement de 94,9 ± 2 %), mais en l'absence de traitement thermique préalable (poudre de SWCNT-1 laissée à température ambiante avant le passage à l'acide), son rendement s'avère non satisfaisant (53,4 ± 15 %). Le cas du traitement à température ambiante est donc à rejeter. Le chauffage semble améliorer l'efficacité de minéralisation. Pourtant, dans le GO, seul le fer voit son extraction s'améliorer avec l'augmentation de la température de traitement (de 141 à 207 $mg.kg^{-1}$ pour les traitements à température ambiante et à 750°C, respectivement). En revanche, l'extraction du Co et du Ni semble constante quelle que soit la température. Et à l'inverse du Fe, la concentration mesurée en Mn diminue avec la température de traitement (de 1712 à 1332 $mg.kg^{-1}$ pour les traitements à température ambiante et à 750°C, respectivement). Cette différence illustre des spécificités entre les métaux, qui pourraient en partie s'expliquer par leur volatilité, l'énergie de vaporisation du Mn étant par exemple plus faible que celle du Fe. Par ailleurs, notons qu'en chauffant, le GO voit sa masse considérablement réduire. Il est initialement constitué pour moitié d'oxygène (environ), qui se libère sous forme de gaz (CO,

CO_2) dès 200°C, principalement (Chapitre 4, partie 3). Il est donc possible qu'en travaillant à partir de seulement 10 mg de poudre, il reste finalement trop peu d'échantillon pouvant être récupéré dans les creusets en céramique. Une partie peut donc être potentiellement perdue lors du transfert dans les DigiTubes et créer un biais. Ainsi appliquée, cette méthode est donc perfectible. Même si elle fonctionne pour le SWCNT-1 à 750°C comme en atteste le pourcentage de rendement, il parait peu fiable de l'utiliser pour des nanoparticules de carbone aussi oxydées que le GO. La perte de masse est en effet trop importante à cause de la libération d'oxygène, et il est actuellement difficile de se procurer de grandes quantités (de l'ordre du gramme) de ce type de nanomatériaux.

Tableau A.1. Concentrations en cobalt, fer, manganèse et nickel dans la poudre de GO traitée selon différentes méthodes. Le rendement du matériau de référence certifié (SWCNT-1) est précisé en fonction de la méthode utilisée, d'après sa concentration théorique (National Research Council Canada, 2016).

		Co	**Fe**	**Mn**	**Ni**
	Concentration théorique du SWCNT-1 ($mg.kg^{-1}$)	15900	2200	135	14400
Méthode 1	Concentration mesurée du SWCNT-1 ($mg.kg^{-1}$)	14550	2150	115	12800
	Rendement (%) du SWCNT-1 (et moyenne ± écart type)	91,5	97,7	85,2	88,9
		90,8 ± 5			
	Concentration mesurée du GO ($mg.kg^{-1}$)	< 23	< 60	1498	69
Méthode 2	Concentration mesurée du SWCNT-1 traité à température ambiante ($mg.kg^{-1}$)	7134	1702	74	5205
	Rendement (%) du SWCNT-1 traité à température ambiante (et moyenne ± écart type)	44,9	77,4	55,2	36,1
		53,4 ± 15			
	Concentration mesurée du SWCNT-1 traité à 750°C ($mg.kg^{-1}$)	15524	2087	126	13497
	Rendement (%) du SWCNT-1 traité à 750°C (et moyenne ± écart type)	97,6	94,9	93,3	93,7
		94,9 ± 2			
	Concentration mesurée du GO traité à température ambiante ($mg.kg^{-1}$)	1,1	141	1712	3
	Concentration mesurée du GO traité à 350°C ($mg.kg^{-1}$)	0,5	199	1525	4
	Concentration mesurée du GO traité à 550°C ($mg.kg^{-1}$)	0,5	182	1397	3
	Concentration mesurée du GO traité à 750°C ($mg.kg^{-1}$)	1,1	207	1332	4

Références bibliographiques

Analytical Chemistry Lab Manual. (n.d.). Simultaneous determination of manganese and nickel in steel by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Retrieved July 14, 2017, from http://sites.cord.edu/chem-330-lab-manual/experiments/icp-aes

Ayouni-Derouiche, L., Méjean, M., Gay, P., Milliand, M.-L., Lantéri, P., Gauthier, L., & Flahaut, E. (2014). Development of efficient digestion procedures for quantitative determination of cobalt and molybdenum catalyst residues in carbon nanotubes. *Carbon*, *80*(1), 59–67. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.08.025

Ge, C., Lao, F., Li, W., Li, Y., Chen, C., Qiu, Y., … Li, B. (2008). Quantitative Analysis of Metal Impurities in Carbon Nanotubes : Efficacy of Different Pretreatment Protocols for ICPMS Spectroscopy Quantitative Analysis of Metal Impurities in Carbon Nanotubes : Efficacy of Different Pretreatment Protocols for ICPMS Spec. *Analytical Chemistry*, *80*(24), 9426–9434. https://doi.org/10.1021/ac801469b

National Research Council Canada. (2016). *SWCNT-1 - Single-wall carbon nanotube certified reference material*. Retrieved from http://www.nrc-cnrc.gc.ca/eng/solutions/advisory/crm/certificates/swcnt_1.html

Liste et statut des publications présentées dans ce manuscrit

Publications acceptées et publiées :

A. Mottier, F. Mouchet, C. Laplanche, S. Cadarsi, L. Lagier, J-C. Arnault, H. A. Girard, V. Leon, E. Vazquez, C. Sarrieu E. Pinelli, L. Gauthier and E. Flahaut. **2016**. Surface area of carbon nanoparticles: a dose metric for a more realistic ecotoxicological assessment. *Nano Letters*, 16: 3514-3518.

L. Lagier, F. Mouchet, C. Laplanche, A. Mottier, S. Cadarsi, L. Evariste, C. Sarrieu, P. Lonchambon, E. Pinelli, E. Flahaut and L. Gauthier. **2017**. Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians. *Carbon*, 119: 72-81.

Publications en cours de soumission :

L. Lagier, F. Mouchet, L. Evariste, S. Cadarsi, A. Mottier, P. Lonchambon, E. Ompraret, G. Chimowa, C. Sarrieu, A-M. Galibert, C. Matei Ghimbeu, E. Flahaut, E. Pinelli and L. Gauthier. **2018**. Removal of genotoxicity of graphene oxide in vivo: towards an environmentally safe-by-design approach. *En cours de soumission dans Environmental Science: Nano*.

L. Lagier, P. Gonzalez, F. Mouchet, L. Evariste, S. Cadarsi, A. Mottier, G. Daffe, P. Lonchambon, E. Flahaut, E. Pinelli and L. Gauthier. **2018**. Influence of the oxidation level of graphene oxide on its toxicity in the liver of *Xenopus laevis*: a molecular approach. *En cours de soumission dans Environmental Science: Nano*.

L. Lagier, F. Mouchet, C. Chary, L. Evariste, A. Mottier, S. Cadarsi, C. Sarrieu, P. Lonchambon, E. Pinelli, E. Flahaut, and L. Gauthier. **2018**. *In vivo* toxicity of graphene oxide in larvae of the Diptera *Chironomus riparius*. *En cours de soumission dans Journal of Hazardous Materials*.

COMMUNICATIONS ET POSTERS

Liste des communications et posters en tant que premier auteur

L. Lagier*, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, E. Vazquez, E. Pinelli and L. Gauthier, **« Ecotoxicité de nanoparticules carbonées chez les larves de *Xenopus laevis* »**, Communication orale durant le colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA) du 31 mai au 1er juin 2015 (Bordeaux, France)

L. Lagier*, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, J.C. Arnault, H. Girard, C. Menard-Moyon, I. Janowska, A. Bianco, E. Vázquez, E. Pinelli and L. Gauthier, **« Compared effects of carbon-based nanoparticules on *Xenopus laevis* tadpole: ecotoxicological assessment »**, Communication orale durant la 10ème conférence ICEENN (International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials) du 6 au 10 septembre 2015 (Vienne, Autriche)

L. Lagier*, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, E. Pinelli and L. Gauthier, **« Compared ecotoxicity of raw and oxidised carbon-based nanoparticles on *Xenopus laevis* larvae »**, Communication orale durant la 26ème rencontre annuelle de la SETAC Europe (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) du 22 au 26 mai 2016 (Nantes, France)

L. Lagier*, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, I. Janowska, C. Menard-Moyon, A. Bianco, E. Vázquez, E. Pinelli and L. Gauthier, **« Does oxidation degree influence the toxicity of multi-layer graphene in *Xenopus laevis* larvae? »**, Communication orale durant la 32ème conférence internationale de la SEGH (Society for Environmental Geochemistry and Health) du 4 au 8 juillet 2016 (Bruxelles, Belgique)

L. Lagier*, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, J.C. Arnault, H. Girard, C. Menard-Moyon, I. Janowska, A. Bianco, E. Vázquez, E. Pinelli and L. Gauthier, **« Compared ecotoxicity of carbon-based nanoparticles on *Xenopus laevis* tadpole »**, Communication orale durant le 7ème CNMBT16 (Symposium on Carbon Nanomaterials Biology, Medicine & Toxicology) le 13 août 2016 (Vienne, Autriche)

L. Lagier*, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, E. Vazquez, J.C. Boutonnet, E. Pinelli and L. Gauthier, **« Ecotoxicity of carbon-based nanoparticles in *Xenopus laevis* larvae »**, Poster présenté durant la 25ème rencontre annuelle de la SETAC Europe (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) du 3 au 7 mai 2015 (Barcelone, Espagne)

L. Lagier*, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, A. Bour, L. Verneuil, J. Silvestre, E. Flahaut, C. Sarrieu, E. Pinelli and L. Gauthier, **« Ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes on Chironomus and *Xenopus* larvae: monospecific and mesocosm tests »**, Poster présenté durant la 26ème rencontre annuelle de la SETAC Europe (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) du 22 au 26 mai 2016 (Nantes, France)

L. Lagier*, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, P. Lonchambon, C. Sarrieu, E. Vázquez, E. Pinelli and L. Gauthier, **« Ecotoxicité du graphène oxydé chez la larve des amphibiens *Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl.* »**, Poster présenté lors du colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA) du 29 au 30 juin 2016 (Reims, France)

L. Lagier*, F. Mouchet, L. Evariste, S. Cadarsi, A. Mottier, P. Lonchambon, C. Sarrieu, E. Flahaut, E. Pinelli and L. Gauthier, **« Toxicity of graphene oxide in larvae of the amphibian *Xenopus laevis* »**, Poster présenté lors de la conférence internationale FEE (Functional Ecology and Environment) du 11 au 12 juillet 2017 (Toulouse, France)

Communication orale durant le colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA) du 31 mai au 1er juin 2015 (Bordeaux, France)

Ecotoxicité de nanoparticules carbonées chez les larves de *xenopus laevis*

L. Lagier, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, E. Vazquez, E. Pinelli and L. Gauthier

Résumé :

De par leurs propriétés uniques, les nanoparticules carbonées (NPCs) telles que les nanotubes de carbone et le graphène sont ou seront amenées à être produites et utilisées à grande échelle dans le monde. Face à ce développement croissant, anticiper les risques environnementaux associés à ces contaminants émergents apparait comme une nécessité. Réceptacle majeur de pollutions, le milieu aquatique pourrait être particulièrement impacté par la libération et le transfert de ces matériaux. Cependant, peu de données écotoxicologiques sont actuellement disponibles concernant les effets potentiels de ces derniers.

L'objectif du présent travail est donc d'évaluer l'écotoxicité de NPCs bien caractérisées chez la larve d'amphibien (*Xenopus laevis*) au moyen d'un test normalisé (ISO 21427-1) [1]. Quatre types de NPCs ont été étudiés : des nanotubes de carbone double (DWCNT) et multi paroi (MWCNT), du graphène (FLG) et du graphène oxydé (GO). Une gamme de concentrations d'exposition allant de 0,1 $mg.L^{-1}$ à 50 $mg.L^{-1}$ a été utilisée. Différents paramètres ont été mesurés, incluant (i) la toxicité aiguë (mortalité), (ii) la toxicité chronique (inhibition de croissance) et la génotoxicité (induction de micronoyaux dans les érythrocytes circulants). De plus, les effets des NPCs ont été comparés les uns aux autres.

Les résultats dépendent du type de NPC. Aucune mortalité significative n'a été observée quel que soit la NPC et sa concentration d'exposition. Par contre, une inhibition de croissance significative s'est manifestée à partir de 10 $mg.L^{-1}$ de DWCNT et à 50 $mg.L^{-1}$ de MWCNT et GO. Les données ne nous ont pas permis d'observer d'inhibition de croissance après exposition au FLG. La toxicité chronique observée chez les larves exposées aux fortes concentrations de CNPs serait limitée aux effets physiques (obstruction des branchies et/ou effets abrasifs et/ou privation de nutriments et/ou compétition avec ces derniers). Une génotoxicité significative a seulement été mise en évidence chez les larves exposées à 0,1 $mg.L^{-1}$ de GO en relation au taux élevé d'érythrocytes en mitose à cette concentration par rapport aux larves contrôle.

Ce travail a été mené dans le cadre du programme européen FP7 FET : Graphene Flagship et du laboratoire commun de recherche NAUTILE (CNRS-UPS-INPT- Arkema France).

Mots clés : nanoparticules carbonées, écotoxicité, *Xenopus laevis*

Références

[1] ISO. 2006. International Standard. Water quality - Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei - Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae. ISO 21427-1, ICS: 13.060.70, Genova - CH.

Communication orale durant la 10ème conférence ICEENN (International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials) du 6 au 10 septembre 2015 (Vienne, Autriche)

Compared effects of carbon-based nanoparticules on *Xenopus laevis* tadpole: ecotoxicological assessment

L. Lagier, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, J.C. Arnault, H. Girard, C. Menard-Moyon, I. Janowska, A. Bianco, E. Vázquez, E. Pinelli and L. Gauthier

Résumé :

Nanomaterials such as carbon-based nanoparticules (CNPs) have properties allowing their use in many fields and may be bioaccessible to the organisms because of their potential release in the environment. Especially in the aquatic environment, the CNPs potential risks needs better understanding.

The goal of the present work is to assess and to compare the ecotoxicity of well characterized CNPs: double and multi-walled carbon nanotubes (DWCNTs, MWCNTs), few-layer graphenes (FLG1, FLG2), nanodiamond (ND) and carbon black (CB). Amphibian larvae (*Xenopus laevis*) were investigated using the ISO 21427-1 standardized test procedure. The exposure concentrations ranged from 0.1 to 50mg.L^{-1}. Various endpoints were studied: (i) acute toxicity (mortality), (ii) chronic toxicity (growth inhibition), and (iii) genotoxicity (induction of micronucleated erythrocytes).

Neither mortality nor genotoxicity were recorded whatever the CNP exposure (type and concentration). However significant growth inhibition was observed from 0.1mg.L^{-1} of CB, 1mg.L^{-1} of ND, 10mg.L^{-1} of DWCNT and FLG2, and at 50mg.L^{-1} of MWCNT and FLG1. Macro-observations suggested that the chronic toxicity in larvae exposed to highest concentrations of CNPs could be limited to physical effects as gill clogging and intestinal obstruction, which could cause respiratory deficiency and/or abrasive effects and/or nutrients deprivation.

This work has been carried out in the frame of the European FP7 FET program: Graphene Flagship and the French joint research Laboratory NAUTILE.

Communication orale durant la 26ème rencontre annuelle de la SETAC Europe (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) du 22 au 26 mai 2016 (Nantes, France)

Compared ecotoxicity of raw and oxidised carbon-based nanoparticles on *Xenopus laevis* larvae

L. Lagier, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, E. Pinelli and L. Gauthier

Résumé :

Carbon-based nanoparticles (CNPs) such as carbon nanotubes or graphene have numerous attractive properties leaching to their use in many application fields whether they are raw or functionalised, such as oxidised. More and more produced, these nanoparticles may finally contaminate the aquatic environment, which is a major receptacle of pollutants.

This work consists in assessing the ecotoxicological risks induced by a range (from 0.05 to 50 $mg.L^{-1}$) of double-walled carbon nanotubes (DWCNTs) and few layer graphene (FLG) on the amphibian *Xenopus laevis*. We studied the influence of surface chemistry by comparing raw materials with their functionalised counterparts by testing different oxidation levels and thus different nanoparticles: oxidised DWCNTs (DWCNTs-ox), graphene oxide (GO), and reduced graphene oxide containing respectively 4 and 17 % (atomic composition) of oxygen (rGO 4%, rGO 17%).

Tests have been carried out with a standardised protocole (ISO, 2006). We focused on various endpoints: (i) mortality, (ii) growth inhibition and (iii) genotoxicity (induction of micronucleated erythrocytes). The mortality was not significantly impacted whatever the type of nanoparticle and tested concentration. In contrast, a significant growth inhibition was observed from 10 $mg.L^{-1}$ of raw DWCNTs and FLG, and at 50 $mg.L^{-1}$ of DWCNTs-ox and GO. On the contrary, growth significantly increased for larvae exposed to 1 $mg.L^{-1}$ of rGO 4% and rGO 17% comparatively to the negative control. No genotoxicity was noted for the raw nanomaterials nor for rGO 4 and 17 %, but significant genotoxicity was observed for DWCNTs-ox at 1 $mg.L^{-1}$ and for GO at 0.1 $mg.L^{-1}$.

The chronic toxicity observed appeared to be limited to physical effects (intestinal obstruction and/or abrasive effects and/or nutrients deprivation and/or gill clogging). However, genotoxic effect could be attributed to intrinsic properties of oxidised nanoparticles. This work has been carried out in the framework of the Graphene Flagship program.

Key words: carbon-based nanoparticles, oxidation, ecotoxicity, *Xenopus laevis*

References

ISO 21427-1. International Standard. Water quality - Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei - Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae. ISO 21427-1, ICS: 13.060.70, Genova – CH (2006).

Communication orale durant la 32ème conférence internationale de la SEGH (Society for Environmental Geochemistry and Health) du 4 au 8 juillet 2016 (Bruxelles, Belgique)

Does oxidation degree influence the toxicity of multi-layer graphene in *Xenopus laevis* larvae?

L. Lagier, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, I. Janowska, C. Menard-Moyon, A. Bianco, E. Vázquez, E. Pinelli and L. Gauthier

Résumé :

The attractive properties of carbon-based nanoparticles like multi-layer graphene (MLG) lead to their use in many application fields, whether they are raw or functionalized, such as oxidized. The production of these nanoparticles is expected to grow exponentially in a near future at the world scale, and may thus make MLG potentially bioavailable for the organisms. Very stable, these particles may finally contaminate the aquatic environment, which is a major receptacle of pollutants. The study of their impact on the ecosystems is thus essential.

This work focuses on the potential toxicity of MLG in *Xenopus laevis* larvae according to the standardized protocol (ISO 21427-1, 2006) to compare the impact of raw MLG with its oxidized counterpart: graphene oxide (GO). The exposure concentrations ranged from 0.1 to 50mg.L^{-1}. To check if the level of oxidation influences the observed toxicity, reduced graphene oxide containing respectively 4 and 17 % (atomic composition) of oxygen (rGO4%, rGO17%) were prepared by reduction of GO in hydrogen, and tested in the low concentrations range 0.05 to 1mg.L^{-1}.

Various endpoints have been investigated: mortality, growth inhibition and genotoxicity (induction of micronucleated erythrocytes). The results did not show any significant mortality. In contrast, a significant growth inhibition was observed from 10mg.L^{-1} of raw MLG, and at 50mg.L^{-1} of GO. On the contrary, growth significantly increased for larvae exposed to 1mg.L^{-1} of rGO4% and rGO17% compared to the negative control. Significant genotoxicity was observed for GO at 0.1mg.L^{-1} only.

The chronic toxicity observed in larvae exposed to high concentrations of MLG could be limited to physical effects such as intestinal obstruction, abrasive effects and nutrients deprivation. Respiratory deficiency may also occur in *Xenopus* because of its potential gill clogging. However, genotoxic effect could be attributed to intrinsic properties (surface chemistry) of GO, which loses its genotoxic potential when reduced.

Communication orale durant le 7ème CNMBT16 (Symposium on Carbon Nanomaterials Biology, Medicine & Toxicology) le 13 août 2016 (Vienne, Autriche)

Compared ecotoxicity of carbon-based nanoparticles on *Xenopus laevis* tadpole

L. Lagier, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, J.C. Arnault, H. Girard, C. Menard-Moyon, I. Janowska, A. Bianco, E. Vázquez, E. Pinelli and L. Gauthier

Résumé :

The production of carbon-based nanoparticles (CNPs) is rapidly increasing worldwide. Their outstanding properties lead to their use in many application fields, but may also make them very reactive with their environment. Currently, hazard associated with these emerging contaminants are still not well evaluated. Anticipating environmental risks is crucial, especially concerning the aquatic environment, which is a major pollution receptacle.

The present work aims to assess and to compare the ecotoxicity of well characterized raw CNPs: double and multi-walled carbon nanotubes (DWCNTs, MWCNTs), few-layer graphenes (FLG1, FLG2), nanodiamond (ND) and carbon black (CB). Functionalized CNPs such as graphene oxide (GO) and reduced GO (rGO) were also tested. Their toxicity were investigated using the ISO 21427-1 standardized procedure on amphibian larvae (*Xenopus laevis*). The exposure concentrations ranged from 0.05 to 50 $mg.L^{-1}$. Various endpoints were studied: acute toxicity (mortality), chronic toxicity (growth inhibition), and genotoxicity (induction of micronucleated erythrocytes).

Neither mortality nor genotoxicity were observed whatever the raw CNP exposure (type and concentration). However, significant growth inhibition was observed from 0.1 $mg.L^{-1}$ of CB, 1 $mg.L^{-1}$ of ND, 10 $mg.L^{-1}$ of DWCNT and FLG2, and at 50 $mg.L^{-1}$ of MWCNT, FLG1 and GO. Only GO induced a significant genotoxicity at 0.1 $mg.L^{-1}$, whereas no genotoxic effect was recorded when GO is reduced.

Macro-observations suggested that the chronic toxicity in larvae exposed to the highest concentrations of CNPs could be limited to physical effects such as gill clogging and intestinal obstruction, which could cause respiratory deficiency and/or abrasive effects and/or nutrients deprivation. The observed genotoxicity may be in relation with the surface chemistry of GO. However larvae were not significantly impacted at high concentration of GO, which may also be related to a decreased mitotic index.

Poster présenté durant la 25ème rencontre annuelle de la SETAC Europe (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) du 3 au 7 mai 2015 (Barcelone, Espagne)

Ecotoxicity of carbon-based nanoparticles in *Xenopus laevis* larvae

L. Lagier, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, C. Sarrieu, E. Vazquez, J.C. Boutonnet, E. Pinelli and L. Gauthier

Résumé :

Because of their unique properties, carbon-based nanoparticles (CNPs) such as multi-walled nanotubes (MW) and double-walled nanotubes (DW), few layer graphene (FLG) and graphene oxyde (GO) are or will be widely produced and used around the world. Faced with this increasing development, anticipate environmental risks associated with these emerging contaminants is a necessity. Aquatic environment may be particularly affected by the release and the transfer of these materials. However, few ecotoxicological data are currently available. The objective of the present work is to assess the ecotoxicity of well characterized CNPs on amphibian larvae *(Xenopus laevis*) using standardized tests (ISO, 2006) [1]. The exposure concentrations ranged from 0.1 to 50 mg/L. Various endpoints were studied, ie (i) acute toxicity (mortality), (ii) chronic toxicity (growth inhibition), and (iii) genotoxicity (induction of micronucleated erythrocytes). Moreover, the effects of CNPs were compared with each other. The results depend on the type of CNPs. No mortality was recorded for all CNPs whatever the concentration. By contrast, significant growth inhibition was observed from 10 mg/L of DW and at 50 mg/L of MW and GO. No growth inhibition was observed for FLG. The chronic toxicity observed in larvae exposed to high concentrations of CNPs could be limited to physical effects (gill clogging and/or abrasive effects and or nutrients deprivation). Genotoxicity has been only observed in larvae exposed to GO. This work has been carried out in the frame of the European FP7 FET program: Graphene Flagship and the French joint laboratory NAUTILE.

Key Words: carbon-based nanoparticles, ecotoxicity, *Xenopus laevis*

References

[1] ISO. 2006. ISO International Standard. Water quality - Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei - Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae. ISO 21427-1, ICS: 13.060.70, Genova - CH.

Ecotoxicity of carbon based nanoparticles in *Xenopus laevis* larvae



L. LAGIER[1,2*], F. MOUCHET[1,2,3], S. CADARSI[1,2], A. MOTTIER[1,2], E. FLAHAUT[3,4,5], C. SARRIEU[4,5], E. VAZQUEZ[5], J-C. BOUTONNET[3,6], E. PINELLI[1,2,3] and L. GAUTHIER[1,2,3]

[1]Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan - [2]CNRS ; EcoLab; F-31326 Castanet-Tolosan - [3]Laboratoire Commun NAUTILE, CNRS n°48361 Arkéma-CNRS-UPS-INPT – [4]Université de Toulouse, INP, UPS, Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), UMR CNRS 5085, F-31062 Toulouse cedex 9 - [5]CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, F-31062 Toulouse, France - [5]UCLM, MSOC Nanochemistry Group, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry-IRICA, 13071 Ciudad Real, Spain - [6]Toxicology & Environment Department, 420 rue d'Estienne d'Orves F-92705 Colombes Cedex, ARKEMA France – *laura.lagier@univ-tlse3.fr



Introduction

- Nanometric size => particularly interesting properties of **carbon-based nanoparticules (CNPs)** => many application fields.
- Potential **releases of manufactured CNPs into the environment**.
- Need to assess the **environmental hazard** of these cNPs, especially in **aquatic environment** as a major receptacle of pollutants.

➢ **Objective**: ecotoxicity assessment of well characterized CNPs on amphibian larvae (*Xenopus laevis*) in standardized conditions.



Materials and methods

CNPs samples : Carbon NanoTubes (CNTs) & Graphenes

	DWCNT (Double Walled CNT)	MWCNT (Multi Walled CNT)	FLG (Few Layer Graphene)	GO (Graphene Oxide)
Synthesis / production	Catalytic chemical vapor deposition	Catalytic chemical vapor deposition	Ball milling of graphite with 1 mg.L^{-1} of melamine	Stirring powdered carbon fiber GANF® + sodium nitrate in sulfuric acid at 0°C + potassium
Catalyst	Co/Mo-MgO	Fe-Al_2O_3	Metal	Nickel
Carbon content	90(wt.%)	90 (wt.%)	99.99(wt.%)	45.22±0.12(wt.%)
Number of walls / layer (from HRTEM)	80% DWCNT, 15% SWCNT, 5% TWCNT	5-15 (100% MWCNT)	Not available	Not available
Size (from TEM)	1 to >100 µm in bundles (lenght), 1-3 nm (ø)	0.1-10 µm (lenght), 10-15 nm (ø)	Not available	80-90 nm (<1400 nm)
Specific surface area (from BET)	980 m^2.g^{-1}	210-260 m^2.g^{-1}	Not available	228 m^2.g^{-1}

Single (SWCNT) and Triple (TWCNT) Carbon NanoTubes

TEM observations

DWCNT 100 nm | MWCNT 100 nm | FLG 400 nm | GO 200 nm

Standardized exposure conditions (ISO 21427-1*)

12 days of semi-static exposure. Daily renewal of media.

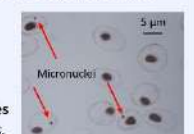
- **NC**: Negative Control, reconstitued water (RW) = deonised water + mineral salts (294 mg.L^{-1} $CaCl_2.2H_2O$, 123.25 mg.L^{-1} $MgSO_4.7H_2O$, 64.75 mg.L^{-1} $NaHCO_3$, 5.75 mg.L^{-1} KCl).
- **PC:** Positive Control of genotoxicity, Cyclophosphamide monohydrate at 20 mg.L^{-1} in RW.



- Concentrations of CNPs in RW from **0.1 to 50 mg.L^{-1}**.
- 20 larvae per condition.

Measured endpoints

- Acute toxicity: percentage of **mortality**.
- Chronic toxicity: **growth inhibition**.
- Genotoxicity: **micronucleated erythrocytes (MNE)** in the circulating blood of *Xenopus*.



Results

Mortality

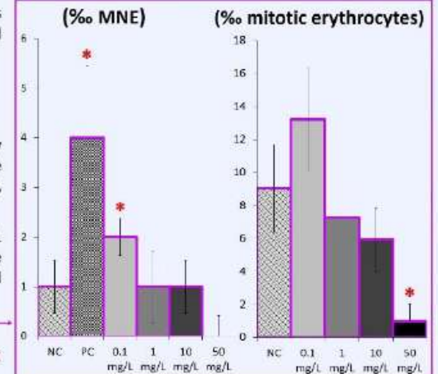
- No significant mortality vs NC whatever the CNP and the concentration.

Genotoxicity

- **No significant genotoxicity vs NC whatever the concentration of DWCNT, MWCNT and FLG.**
- But GO genotoxicity at 0.1 mg.L^{-1} which may be related to increased mitotic index.

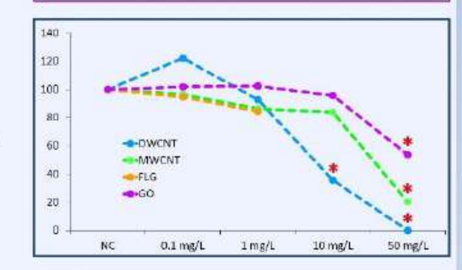
*: significant difference vs NC

GO Genotoxicity



Growth rate (%)

No data available at 10 and 50 mg.L^{-1} of FLG



Macro observations (binocular)

NC

The arrows show the aggregation of CNPs.

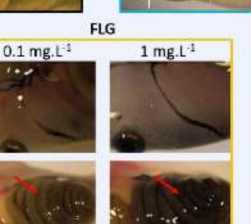
DWCNT

10 mg.L^{-1}

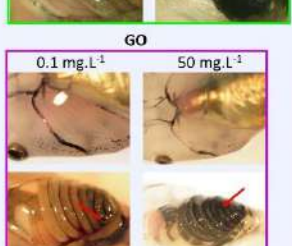
MWCNT



FLG



GO



Conclusions

Acute toxicity & genotoxicity

➢ **No mortality nor genotoxicity** in larvae exposed to **DWCNTs, MWCNTs,** and **FLG** according to standardized exposure conditions.

➢ No mortality in larvae exposed to **GO** but **significant genotoxicity** at 0.1 mg.L^{-1} which would be related to the high number of mitosis.

Chronic toxicity

➢ **Significant growth inhibition** in larvae from 10 mg.L^{-1} of DWCNTs and at 50 mg.L^{-1} of MWCNTs and GO compared to NC larvae.

➢ The chronic toxicity observed in larvae exposed to high concentrations of CNPs would be limited to physical effects (gill clogging and/or abrasive effects and or nutrients deprivation).

Macro observations

➢ Gills more (DWCNTs) or less (FLG, GO) clogged, depending on the CNP type and its concentration.

➢ Intestines full of CNPs, before their excretion.



*ISO 2006 International Standard. Water quality – Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei – Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae. ISO 21427-1, ICS: 13.060.70, GENOVA – CH, (2006)

Poster présenté durant la 26ème rencontre annuelle de la SETAC Europe (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) du 22 au 26 mai 2016 (Nantes, France)

Ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes on *Chironomus* and *Xenopus* larvae: monospecific and mesocosm tests

L. Lagier, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, A. Bour, L. Verneuil, J. Silvestre, E. Flahaut, C. Sarrieu, E. Pinelli and L. Gauthier

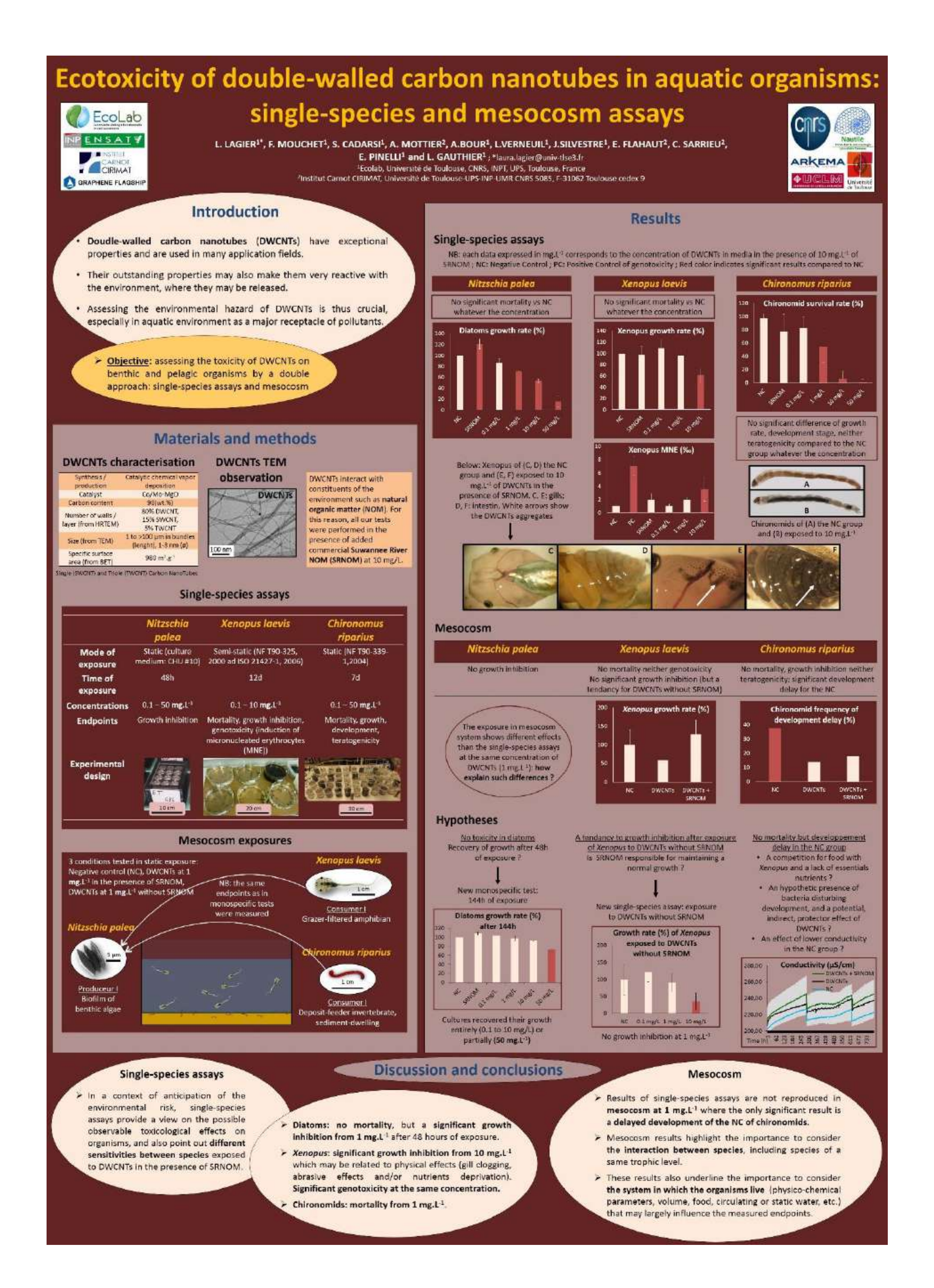
Résumé :

Carbon-based nanoparticles (CNPs) can be found in many manufactured products and are thus likely to be released in the environment. Among them, double-walled carbon nanotubes (DWCNTs) are well characterized and may be considered as a control nanomaterial to investigate the effects of CNPs on organisms, particularly in the aquatic environment, which is a major receptacle of pollutants.

The goal of the present work is (i) to improve the understanding of toxicity mechanisms of a range of concentrations (from 0.1 to 50 $mg.L^{-1}$ of DWCNTs) on benthic and pelagic organisms by a monospecific approach and (ii) to assess the ecotoxicological risks by using more realistic conditions in a mesocosm, with an interaction between species. DWCNTs are known to interact with constituents of the environment such as natural organic matter (NOM). For this reason, all our tests were performed in the presence of added commercial Suwannee River NOM.

Two standardized single-species tests were carried out, respectively, for two aquatic models: *Chironomus riparius* and *Xenopus laevis*. The effect of DWCNTs on monospecific phototroph biofilm of *Nitzschia palea* was tested too. In a second step, these organisms have been grouped within a food chain and exposed to 1 $mg.L^{-1}$ of exposure water. Studied endpoints for chironomids were acute (mortality), chronic toxicity (growth and development delay) and teratogenicity. Furthermore, mortality, growth inhibition and genotoxicity (induction of micronucleated erythrocytes) were studied on *Xenopus*. In monospecific tests, an algal growth delay was measured after 48 h of exposure from 1$mg.L^{-1}$. The survival rate of chironomids was significantly impacted from 1 $mg.L^{-1}$. No significant teratogenicity neither growth inhibition was observed. However the frequency of development delay was lower than the negative control from 1 mg L^{-1}. The results didn't show mortality for *Xenopus* but significant growth inhibition and genotoxicity (induction of micronucleated erythrocytes) were noted at 10 $mg.L^{-1}$. Macro-observations suggested that the chronic toxicity could be limited to physical effects (intestinal obstruction and/or abrasive effects and/or nutrients deprivation and/or gill clogging). No effect was observed for all species in mesocosm configuration except a significant growth delay in the chironomid negative control, maybe due to a competition with *Xenopus* for food.

<u>Key Words</u>: double-walled carbon nanotubes, ecotoxicity, *Xenopus laevis*, *Chironomus riparius*


Ecotoxicity of double-walled carbon nanotubes in aquatic organisms: single-species and mesocosm assays
L. LAGIER1*, F. MOUCHET1, S. CADARSI1, A. MOTTIER2, A.BOUR1, L.VERNEUIL1, J.SILVESTRE1, E. FLAHAUT2, C. SARRIEU2, E. PINELLI1 and L. GAUTHIER1 ; *laura.lagier@univ-tlse3.fr
1Ecolab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France
2Institut Carnot CIRIMAT, Université de Toulouse-UPS-INP-UMR CNRS 5085, F-31062 Toulouse cedex 9
EcoLab
ENSAT
CIRIMAT
GRAPHENE FLAGSHIP
cnrs
Nautile
ARKEMA
UCLM
Université de Toulouse
Introduction
Doudle-walled carbon nanotubes (DWCNTs) have exceptional properties and are used in many application fields.
Their outstanding properties may also make them very reactive with the environment, where they may be released.
Assessing the environmental hazard of DWCNTs is thus crucial, especially in aquatic environment as a major receptacle of pollutants.
Objective: assessing the toxicity of DWCNTs on benthic and pelagic organisms by a double approach: single-species assays and mesocosm
Materials and methods
DWCNTs characterisation
DWCNTs TEM observation
DWCNTs interact with constituents of the environment such as natural organic matter (NOM). For this reason, all our tests were performed in the presence of added commercial Suwannee River NOM (SRNOM) at 10 mg/L.
Single-species assays
Nitzschia palea
Xenopus laevis
Chironomus riparius
Mode of exposure
Time of exposure
Concentrations
Endpoints
Experimental design
Mesocosm exposures
Results
Single-species assays
Mesocosm
Hypotheses
Discussion and conclusions
Single-species assays
In a context of anticipation of the environmental risk, single-species assays provide a view on the possible observable toxicological effects on organisms, and also point out different sensitivities between species exposed to DWCNTs in the presence of SRNOM.
Diatoms: no mortality, but a significant growth inhibition from 1 mg.L-1 after 48 hours of exposure.
Xenopus: significant growth inhibition from 10 mg.L-1 which may be related to physical effects (gill clogging, abrasive effects and/or nutrients deprivation). Significant genotoxicity at the same concentration.
Chironomids: mortality from 1 mg.L-1.
Mesocosm
Results of single-species assays are not reproduced in mesocosm at 1 mg.L-1 where the only significant result is a delayed development of the NC of chironomids.
Mesocosm results highlight the importance to consider the interaction between species, including species of a same trophic level.
These results also underline the importance to consider the system in which the organisms live (physico-chemical parameters, volume, food, circulating or static water, etc.) that may largely influence the measured endpoints.

Poster présenté lors du colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA) du 29 au 30 juin 2016 (Reims, France)

Ecotoxicité du graphène oxydé chez la larve des amphibiens *Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl*.

L. Lagier, F. Mouchet, S. Cadarsi, A. Mottier, E. Flahaut, P. Lonchambon, C. Sarrieu, E. Vázquez, E. Pinelli and L. Gauthier

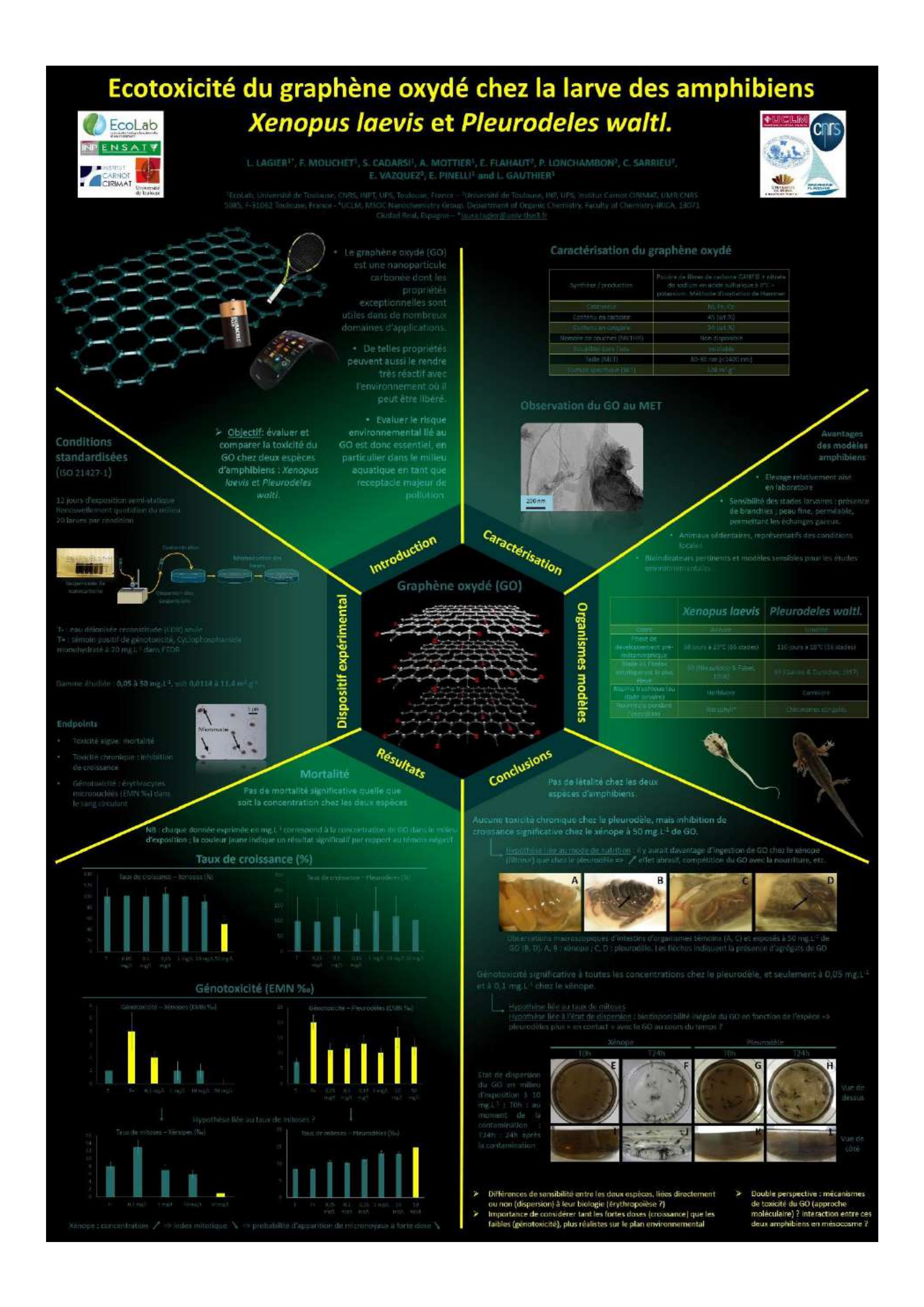
Résumé :

La production de nanoparticules carbonées telles que le graphène oxydé (GO) est en plein essor à l'échelle mondiale. Leurs propriétés remarquables font d'elles des outils précieux pour de nombreux domaines d'applications, mais peuvent aussi les rendre particulièrement réactives avec leur environnement. A ce jour, les dangers associés à ces contaminants émergents sont encore mal évalués. Anticiper le risque environnemental est essentiel, en particulier concernant les milieux aquatiques, véritables réceptacles de pollution.

La présente étude vise à évaluer le risque écotoxicologique d'un GO bien caractérisé selon une procédure standardisée (ISO 21427-1, 2006) chez la larve des amphibiens *Pleurodeles waltl*. et *Xenopus laevis*. La gamme de concentration étudiée s'étend de 0,05 à 50 mg.L^{-1}. Différents paramètres ont été étudiés chez les deux espèces : toxicité aiguë (mortalité), chronique (inhibition de croissance), et génotoxicité (induction de micronoyaux dans les érythrocytes).

Les résultats sont fonction de l'espèce. Aucune mortalité n'a été relevée chez les deux amphibiens quelle que soit la concentration de GO. Le xénope a montré une inhibition de croissance significative à 50 mg.L^{-1} alors qu'aucune toxicité chronique n'a pu être mise en évidence chez le pleurodèle. Par contre, ce dernier a montré un effet génotoxique à toutes les concentrations tandis qu'une induction significative d'érythrocytes micronucléés n'a été observée qu'à 0,05 et 0,1 mg.L^{-1} chez le xénope.

La toxicité chronique observée chez le xénope exposé aux fortes concentrations de GO pourrait être limitée aux effets abrasifs, à la compétition nutritive et / ou au colmatage des branchies. De tels effets physiques pourraient également avoir lieu chez le pleurodèle, mais il est possible qu'ils soient limités du fait du comportement non-filtreur de cette espèce. La génotoxicité observée semble impliquer différents mécanismes sous-jacents chez les deux espèces : les xénopes ne sont par exemple impactés qu'à faible concentration, ce qui pourrait être mis en relation avec une diminution du nombre de mitoses aux fortes concentrations.


Ecotoxicité du graphène oxydé chez la larve des amphibiens
Xenopus laevis et Pleurodeles waltl.
EcoLab
INP ENSAT
Institut Carnot CIRIMAT
Université de Toulouse
UCLM
cnrs
L. LAGIER[1*], F. MOUCHET[1], S. CADARSI[1], A. MOTTIER[1], E. FLAHAUT[2], P. LONCHAMBON[2], C. SARRIEU[2], E. VAZQUEZ[3], E. PINELLI[1] and L. GAUTHIER[1]
Le graphène oxydé (GO) est une nanoparticule carbonée dont les propriétés exceptionnelles sont utiles dans de nombreux domaines d'applications.
De telles propriétés peuvent aussi le rendre très réactif avec l'environnement où il peut être libéré.
Evaluer le risque environnemental lié au GO est donc essentiel, en particulier dans le milieu aquatique en tant que receptacle majeur de pollution.
Objectif: évaluer et comparer la toxicité du GO chez deux espèces d'amphibiens : Xenopus laevis et Pleurodeles waltl.
Caractérisation du graphène oxydé
Observation du GO au MET
200 nm
Avantages des modèles amphibiens
Elevage relativement aisé en laboratoire
Sensibilité des stades larvaires : présence de branchies ; peau fine, perméable, permettant les échanges gazeux.
Animaux sédentaires, représentatifs des conditions locales
Bioindicateurs pertinents et modèles sensibles pour les études environnementales
Conditions standardisées
(ISO 21427-1)
12 jours d'exposition semi-statique
Renouvellement quotidien du milieu
20 larves par condition
Introduction
Caractérisation
Graphène oxydé (GO)
Dispositif expérimental
Organismes modèles
Résultats
Conclusions
Xenopus laevis
Pleurodeles waltl.
Endpoints
Toxicité aigue: mortalité
Toxicité chronique : inhibition de croissance
Génotoxicité : érythrocytes micronucléés (EMN ‰) dans le sang circulant
Mortalité
Pas de mortalité significative quelle que soit la concentration chez les deux espèces
Pas de létalité chez les deux espèces d'amphibiens.
Aucune toxicité chronique chez le pleurodèle, mais inhibition de croissance significative chez le xénope à 50 mg.L-1 de GO.
Hypothèse liée au mode de nutrition : il y aurait davantage d'ingestion de GO chez le xénope (filtreur) que chez le pleurodèle => effet abrasif, compétition du GO avec la nourriture, etc.
NB : chaque donnée exprimée en mg.L-1 correspond à la concentration de GO dans le milieu d'exposition ; la couleur jaune indique un résultat significatif par rapport au témoin négatif
Taux de croissance (%)
A
B
C
D
Observations macroscopiques d'intestins d'organismes témoins (A, C) et exposés à 50 mg.L-1 de GO (B, D). A, B : xénope ; C, D : pleurodèle. Les flèches indiquent la présence d'agrégats de GO
Génotoxicité (EMN ‰)
Génotoxicité significative à toutes les concentrations chez le pleurodèle, et seulement à 0,05 mg.L-1 et à 0,1 mg.L-1 chez le xénope.
Hypothèse liée au taux de mitoses
Hypothèse liée à l'état de dispersion : biodisponibilité inégale du GO en fonction de l'espèce => pleurodèles plus « en contact » avec le GO au cours du temps ?
Hypothèse liée au taux de mitoses ?
Xénope
Pleurodèle
T0h
T24h
E
F
G
H
I
J
K
L
Etat de dispersion du GO en milieu d'exposition à 10 mg.L-1 : T0h : au moment de la contamination ; T24h : 24h après la contamination
Vue de dessus
Vue de côté
Différences de sensibilité entre les deux espèces, liées directement ou non (dispersion) à leur biologie (érythropoïèse ?)
Importance de considérer tant les fortes doses (croissance) que les faibles (génotoxicité), plus réalistes sur le plan environnemental
Double perspective : mécanismes de toxicité du GO (approche moléculaire) ? Interaction entre ces deux amphibiens en mésocosme ?

Poster présenté lors de la conférence internationale FEE (Functional Ecology and Environment) du 11 au 12 juillet 2017 (Toulouse, France)

Toxicity of graphene oxide in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*

L. Lagier, F. Mouchet, L. Evariste, S. Cadarsi, A. Mottier, P. Lonchambon, C. Sarrieu, E. Flahaut, E. Pinelli and L. Gauthier

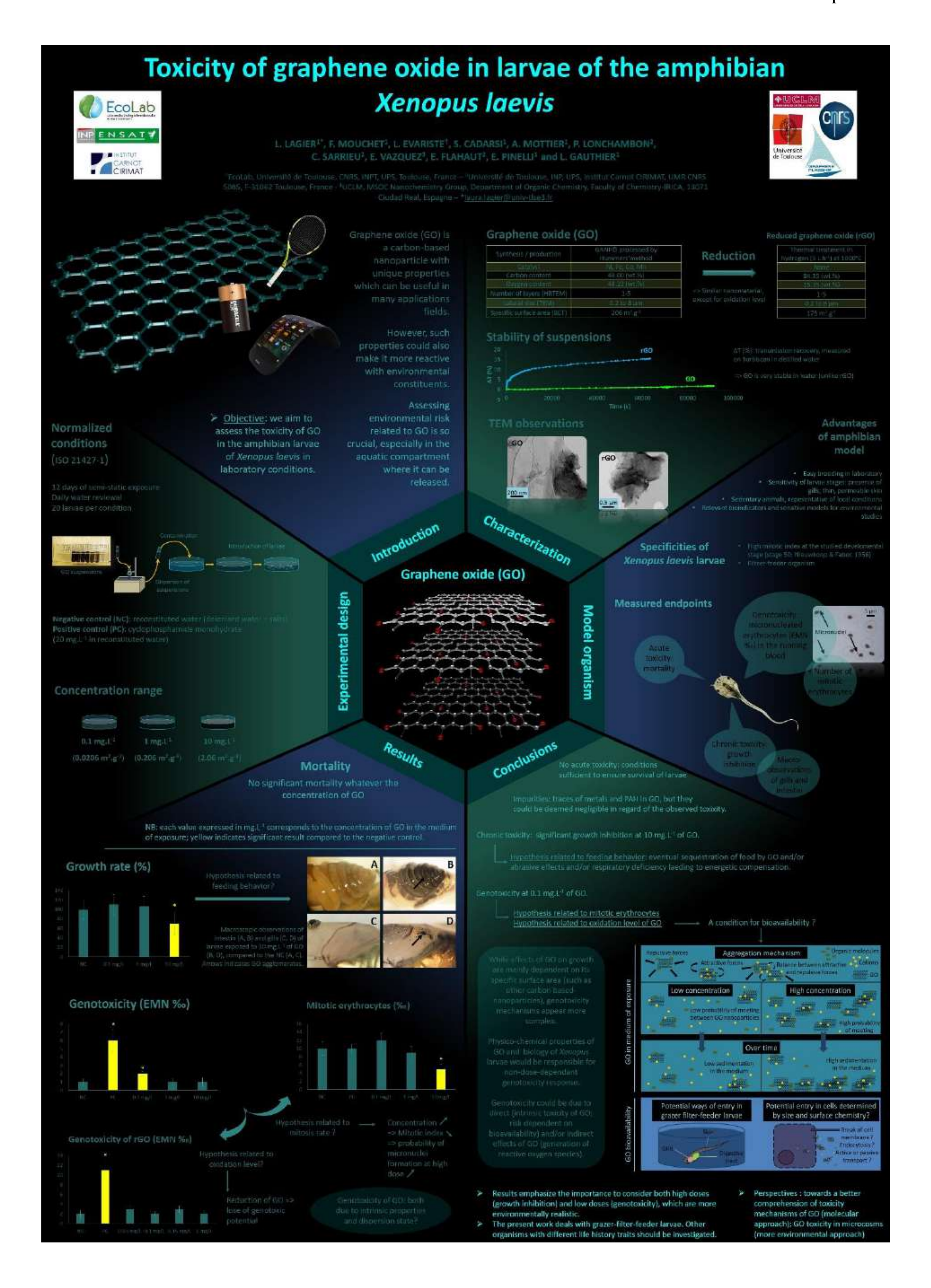
Résumé :

The production of carbon-based nanoparticles such as graphene oxide (GO) is rapidly increasing worldwide. Their outstanding properties lead to their use in many application fields, but may also make them very reactive with their environment. Currently, hazard associated with these emerging contaminants are still not well evaluated. Anticipating environmental risks is crucial, especially concerning aquatic environment, which is a major pollution receptacle. The potential adverse effects of GO on aquatic organisms must receive great attention.

This work aims to assess the toxicity (especially genotoxicity) of GO in *Xenopus laevis* larvae following a 12-days semi-static exposure based on the standardized protocol ISO 21427-1. The exposure concentrations ranged from 0.1 to 10 mg.L^{-1}. While no mortality was observed whatever the condition, larvae exposed to the higher concentration show significant growth inhibition. A non-dose-dependent significant induction of micronucleated erythrocytes was observed in larvae exposed to 0.1mg.L^{-1}.

Eventual impurities (metals and PAHs residues) were dosed in GO in order to check if they could take part in the observed toxicity. However, they were deemed negligible. Macro-observations suggested that chronic toxicity could be limited to physical effects such as gill clogging and intestinal obstruction, which could cause respiratory deficiency and/or nutrients deprivation. The observed genotoxicity was supposed to be in relation with GO oxidation level, since GO was found no more genotoxic after reduction. The genotoxic effects of GO on larvae could so be attributed to intrinsic properties of the nanoparticle, including its physico-chemical properties and its state of dispersion.

This study is based on controlled laboratory conditions but it can reflect a major environmental problem because major toxicity was reported at low environmentally realistic concentration.


Toxicity of graphene oxide in larvae of the amphibian Xenopus laevis
EcoLab
ENSAT
INSTITUT CARNOT CIRIMAT
UCLM
cnrs
Université de Toulouse
L. LAGIER[1*], F. MOUCHET[1], L. EVARISTE[1], S. CADARSI[1], A. MOTTIER[1], P. LONCHAMBON[2],
C. SARRIEU[2], E. VAZQUEZ[3], E. FLAHAUT[2], E. PINELLI[1] and L. GAUTHIER[1]
Graphene oxide (GO) is a carbon-based nanoparticle with unique properties which can be useful in many applications fields.
However, such properties could also make it more reactive with environmental constituents.
Assessing environmental risk related to GO is so crucial, especially in the aquatic compartment where it can be released.
Objective: we aim to assess the toxicity of GO in the amphibian larvae of Xenopus laevis in laboratory conditions.
Graphene oxide (GO)
Reduction
Reduced graphene oxide (rGO)
Stability of suspensions
rGO
GO
TEM observations
GO
rGO
Advantages of amphibian model
Normalized conditions (ISO 21427-1)
12 days of semi-static exposure
Daily water renewal
20 larvae per condition
Introduction
Characterization
Graphene oxide (GO)
Experimental design
Model organism
Results
Conclusions
Specificities of Xenopus laevis larvae
Measured endpoints
Concentration range
0.1 mg.L-1
1 mg.L-1
10 mg.L-1
(0.0206 m².g-1)
(0.206 m².g-1)
(2.06 m².g-1)
Mortality
No significant mortality whatever the concentration of GO
No acute toxicity: conditions sufficient to ensure survival of larvae
Impurities: traces of metals and PAH in GO, but they could be deemed negligible in regard of the observed toxicity.
NB: each value expressed in mg.L-1 corresponds to the concentration of GO in the medium of exposure; yellow indicates significant result compared to the negative control.
Chronic toxicity: significant growth inhibition at 10 mg.L-1 of GO.
Hypothesis related to feeding behavior: eventual sequestration of food by GO and/or abrasive effects and/or respiratory deficiency leading to energetic compensation.
Genotoxicity at 0.1 mg.L-1 of GO.
Hypothesis related to mitotic erythrocytes
Hypothesis related to oxidation level of GO
A condition for bioavailability ?
Growth rate (%)
Hypothesis related to feeding behavior?
A
B
C
D
Genotoxicity (EMN ‰)
Mitotic erythrocytes (‰)
Genotoxicity of rGO (EMN ‰)
Aggregation mechanism
Low concentration
High concentration
Over time
GO in medium of exposure
GO bioavailability
Potential ways of entry in grazer filter-feeder larvae
Potential entry in cells determined by size and surface chemistry?
Results emphasize the importance to consider both high doses (growth inhibition) and low doses (genotoxicity), which are more environmentally realistic.
The present work deals with grazer-filter-feeder larvae. Other organisms with different life history traits should be investigated.
Perspectives : towards a better comprehension of toxicity mechanisms of GO (molecular approach); GO toxicity in microcosms (more environmental approach)

AUTRES COMMUNICATIONS ET POSTER EN TANT QUE CO-AUTEUR

E. Flahaut*, L. Lagier, F. Mouchet, A. Mottier, L. Evariste, C. Sarrieu, G. Chimowa, P. Lonchambon, C. Laplanche, J.C. Arnault, H. Girard, E. Pinelli, L. Gauthier, **« Surface area as the most suitable metric for the evaluation of the potential impact of nanocarbons on the environment »**, Communication orale durant les 7èmes rencontres annuelles en nanométrologie, le 5 décembre 2017 (Lyon, France)

E. Flahaut*, L. Lagier, F. Mouchet, A. Mottier, L. Evariste, C. Sarrieu, G. Chimowa, P. Lonchambon, C. Laplanche, E. Pinelli, L. Gauthier, **« Nanocarbons: synthesis and potential impact on health and the environnement »**, Communication orale lors de la conférence NanoInnovation 2017, du 26 au 29 septembre 2017 (Rome, Italie)

L. Gauthier*, F. Mouchet, S. Cadarsi, L. Lagier, M. Garacci, A. Mottier, L. Evariste, E. Flahaut, C. Sarrieu, P. Lonchambon, G. Chimowa and E. Pinelli, **« Ecotoxicity assessment of carbon-based nanoparticles using single-species test-systems *vs* microcosm exposures »**, Communication orale durant le 8ème CNMBT17 (Symposium on Carbon Nanomaterials Biology, Medicine & Toxicology) le 30 juin 2017 (Belo Horizonte, Brésil)

A. Mottier, L. Evariste*, F. Mouchet, C. Laplanche, L. Lagier, J-C. Arnault, E. Vazquez, C. Sarrieu, E. Pinelli, L. Gauthier, E. Flahaut*, **« Surface Area is the Most Suited Metric for Environmental Impact Assessment of Carbon Nanoparticles »**, Poster présenté durant le MRS Fall meeting du 27 novembre au 2 décembre 2016 (Boston (MA), USA)

A. Mottier*, F. Mouchet, C. Laplanche, S. Cadarsi, L. Lagier, C. Sarrieu, E. Pinelli, L. Gauthier, E. Flahaut, **« Ecotoxicity of nano-carbon allotropes in *X. laevis* larvae, the choice of the right dose-metric »**, Communication orale durant la 32ème conférence internationale de la SEGH (Society for Environmental Geochemistry and Health) du 4 au 8 juillet 2016 (Bruxelles, Belgique)

E. Flahaut*, F. Mouchet, A. Mottier, S. Cadarsi, L. Lagier, E. Pinelli, L. Gauthier, **« Nanotube de Carbone et Ecotoxicologie »**, Communication orale présentée lors du congrès de l'Ecole de GIENS (Groupe Interdisciplinaire pour l'étude des Effets environnementaux des NanotechnologieS) du 27 au 29 octobre 2015 (Luzarches, France)

A. Mottier*, F. Mouchet, L. Lagier, S. Cadarsi, A. Bour, C. Larue, E. Flahaut, C. Sarrieu, E. Pinelli, L. Gauthier, **« Écotoxicologie aquatique des nanoparticules carbonées chez le modèle amphibien »**, Communication orale présentée lors du congrès de l'Ecole de GIENS (Groupe Interdisciplinaire pour l'étude des Effets environnementaux des NanotechnologieS) du 27 au 29 octobre 2015 (Luzarches, France)

E. Flahaut*, F. Mouchet, A. Mottier, C. Sarrieu, S. Cadarsi, L. Lagier, J-C. Arnault, E. Vazquez, E. Pinelli, L. Gauthier, **« Compared environmental impact of carbon nanoparticles »**, Communication orale lors du congrès NANOBIOAPP 2015, Latest Advances on Nanomaterials for Biomedical Applications, du 21 au 23 septembre 2015 (Barcelone, Espagne)

Flahaut*, F. Mouchet, A. Mottier, C. Sarrieu, S. Cadarsi, L. Lagier, J-C. Arnault, E. Vazquez, E. Pinelli, L. Gauthier, « **Comparison of the environmental impact of carbon nanoparticles (carbon nanotubes, nanodiamonds, few-layer graphene)** », Communication orale lors du congrès TNT2015 (Trends in NanoTechnology) du 7 au 11 septembre 2015 (Toulouse, France)

TITLE: Comparative ecotoxicity of graphene oxide and other carbon-based nanoparticles in freshwater model organisms: from an assessment in monospecific conditions towards the study of an experimental trophic chain

---

ABSTRACT

The ecotoxicity of different carbon-based nanoparticles (CNPs) was assessed in freshwater organisms, especially in *Xenopus laevis*. The surface of the CNPs was shown to be the more relevant parameter to describe the growth inhibition in *Xenopus*, regardless of their allotropic form and their state of dispersion. Micronucleus induction was also studied in *Xenopus* and graphene oxide (GO) was found genotoxic at low dose. This result was in compliance with the study of genes expression. The involved toxicity mechanisms would be related to the oxidized functions of the CNP. Moreover, GO was also found responsible for genotoxicity in *Pleurodeles waltl*. and for teratogenicity, development delay and growth inhibition in *Chironomus riparius*. These organisms have finally been put together in a mesocosm, which has also led to genotoxicity in *Pleurodeles* in the presence of GO.

KEY WORDS: carbon allotropes, graphene oxide, reduced graphene oxide, dispersion, growth inhibition, genotoxicity, molecular mechanisms, development delay, teratogenicity, amphibian, invertebrate, mesocosm

---

AUTEUR : Laura LAGIER

TITRE : Ecotoxicité comparative de l'oxyde de graphène et d'autres nanoparticules de carbone chez des organismes aquatiques modèles : d'une évaluation en conditions monospécifiques vers l'étude d'une chaîne trophique expérimentale

DIRECTEUR ET CODIRECTEUR DE THESE : Laury GAUTHIER, Florence MOUCHET

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : ENSAT, le mercredi 8 novembre 2017

RESUME

L'écotoxicité de différentes nanoparticules de carbone (NPC) a été évaluée chez des organismes aquatiques, en particulier chez *Xenopus laevis*. Il a été montré que la surface des NPC est le paramètre le plus pertinent pour décrire l'inhibition de croissance chez le xénope, indépendamment de leur forme allotropique et de leur état de dispersion. L'induction des micronoyaux a aussi été étudiée chez le xénope, et l'oxyde de graphène (GO) s'est révélé génotoxique à faible dose, résultat corroboré par l'étude de l'expression des gènes. Les mécanismes de toxicité impliqués seraient notamment liés aux fonctions oxygénées de la particule. De plus, le GO a aussi entrainé de la génotoxicité chez *Pleurodeles waltl.* et de la tératogénicité, des retards de développement et de l'inhibition de croissance chez *Chironomus riparius*. La mise en interaction de ces organismes au sein d'un mésocosme a également conduit à l'observation de génotoxicité chez le pleurodèle en présence de GO.

MOTS CLES : allotropes de carbone, oxyde de graphène, oxyde de graphène réduit, dispersion, inhibition de croissance, génotoxicité, mécanismes moléculaires, retard de développement, tératogénicité, amphibien, invertébré, mésocosme

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE

Ecologie Fonctionnelle

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Laboratoire Ecolab, Avenue de l'Agrobiopole – BP 32607, 31326 Castanet Tolosan Cedex